

Eine Hot-Spot-Segmentstrategie zum Entwurf von Mimetika der Kreuzamyloid-Interaktionsflächen als Amyloidinhibitoren

Erika Andreetto, Eleni Malideli, Li-Mei Yan, Michael Kracklauer, Karine Farbiarz, Marianna Tatarek-Nossol, Gerhard Rammes, Elke Prade, Tatjana Neumüller, Andrea Caporale, Anna Spanopoulou, Maria Bakou, Bernd Reif und Aphrodite Kapurniotu*

Abstract: Der Entwurf von Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die die amyloidogene Selbstassemblierung herbeiführen, ist ein sehr anspruchsvolles Vorhaben. Dies liegt an der dynamischen Natur der beteiligten Strukturen und Proteinflächen. Die Wechselwirkungen von amyloidogenen Polypeptiden mit anderen Proteinen sind wichtige Modulatoren ihrer Selbstassoziation. Hier stellen wir eine Hot-Spot-Segmentverknüpfungsstrategie zum Entwurf einer Serie von Mimetika der IAPP-Kreuzinteraktionsfläche mit A β (ISMs) als nanomolare Inhibitoren der Amyloidogenese und Zelltoxizität von A β , IAPP oder beiden Polypeptiden vor. Dabei bestimmt die Natur des Verknüpfungselements die Struktur der ISMs und ihre inhibitorische Funktion, im Bezug auf sowohl Inhibitorpotenz als auch Zielmolekül-Selektivität. Die ISMs sind außerdem in der Lage, zusätzlich zur Selbst- auch die kreuznukleierte IAPP-Selbstassoziation effektiv zu unterdrücken. Unsere Ergebnisse bieten eine neuartige Klasse von hochpotenten Peptidleitstrukturen, die auf die Hemmung der Proteinaggregation in der Alzheimer-Krankheit, dem Typ-2-Diabetes oder beiden Krankheiten abzielt, sowie eine chemische Strategie zur Inhibition der amyloiden Selbstassoziation und der pathogenen Wechselwirkungen auch anderer Proteine.

[*] Dr. E. Andreetto,^[+] Dipl.-Chem. E. Malideli,^[+] Dr. L.-M. Yan,^[+] Dipl.-Ing. M. Kracklauer, M. Sc. K. Farbiarz, Dr. A. Caporale, M. Sc. A. Spanopoulou, B. Sc. M. Bakou, Prof. Dr. A. Kapurniotu Fachgebiet Peptidbiochemie, Technische Universität München Emil-Erlenmeyer-Forum 5, 85354 Freising (Deutschland)
E-Mail: akapurniotu@wzw.tum.de

Dipl.-Chem. M. Tatarek-Nossol
Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie
Universitätsklinikum, RWTH Aachen University
Aachen (Deutschland)

Prof. Dr. G. Rammes, T. Neumüller
Department für Anesthesiologie
Technische Universität München/Klinikum Rechts der Isar
München (Deutschland)

M. Sc. E. Prade, Prof. Dr. B. Reif
Department Chemie, Technische Universität München
Garching (Deutschland)
und
Helmholtz Zentrum München (HMGU)
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Neuherberg (Deutschland)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201504973> zu finden.

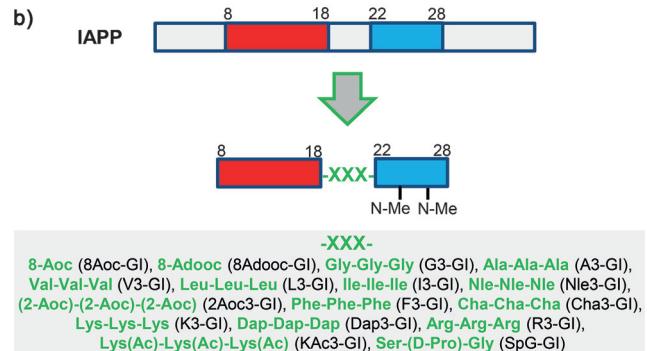
Die Selbstassoziation von Proteinen zu Amyloidfibrillen steht im Zusammenhang mit einer Reihe von schwerwiegenden zelldegenerativen Krankheiten.^[1,2] Der Entwurf von Proteinaggregationsinhibitoren erweist sich als ein sehr anspruchsvolles Vorhaben. Dies lässt sich hauptsächlich auf die konformativen Flexibilitäten vieler amyloidogener Polypeptide zurückführen.^[1,3] So ist etwa die Amyloidogenese des β -Amyloidpeptids (A β) bei der Alzheimer-Krankheit (AD) und des Inselamyloid-Polypeptids (IAPP) beim Typ-2-Diabetes (T2D) durch die Umwandlung von dynamischen, nicht-fibrillären konformativen Ensembles in transient gebildete und unzureichend charakterisierte, β -faltblattreiche, zelltoxische Aggregate charakterisiert.^[1,3-5]

Bis heute hat keiner der bisherigen Inhibitoren der A β -bzw. IAPP-Amyloidogenese klinische Anwendung gefunden.^[1,3] Darüber hinaus weisen mehrere Evidenzen auf eine Verbindung zwischen AD und T2D hin.^[6-10] Daher könnten Moleküle, die in der Lage wären, die Selbstassoziation sowohl von A β als auch von IAPP zu unterdrücken, vielversprechende Kandidaten für Therapeutika sein.

a)



b)



Schema 1. Inhibitor-Designstrategie, Linkerelemente und ISMs. a) Sequenzen von A β 40 und IAPP; Hot-Spot-Segmente der A β 40/IAPP-Wechselwirkungsfläche sind farbig hervorgehoben.^[11] Graue Pfeile: Segmente, die an der Bildung der amyloiden β -Faltblattstruktur beteiligt sind.^[12-13] b) Designstrategie und Linkerelemente (grün) (Abkürzungen: 2- oder 8-Aoc: 2- bzw. 8-Aminooctansäure; 8-Adooc: 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure; Cha: Cyclohexylalanin; Dap: 2,3-Diaminopropionsäure; Lys(Ac): Lysin mit acetylierter N^ε-Aminogruppe). Die Namensabkürzungen der ISMs (C-terminales Amid) sind in Klammern genannt.

Die Wechselwirkungen von zur Aggregation neigenden Polypeptiden mit anderen Proteinen sind wichtige Modulatoren ihrer Selbstassoziation.^[1,2,7,8,10,14,15] Wir haben gezeigt, dass nicht-fibrilläre A β -Spezies nicht-fibrilläre IAPP-Spezies mit hoher Affinität *in vitro* binden können, und dass die A β -IAPP-Wechselwirkung mit einer Unterdrückung der Selbstassoziation beider Polypeptide einhergeht.^[16,17] Die potentielle physiologische Bedeutung dieser Wechselwirkung – sollte sie *in vivo* vorhanden sein – ist noch unklar.^[7-10,18] Dennoch deuten jüngste Ergebnisse darauf hin, dass sie zum Entwurf von Amyloidinhibitoren verwendet werden kann.^[17,19,20] In der Tat sind IAPP-GI und verwandte Volllängen-IAPP-Analoga in der Lage, die amyloidogene Selbstassoziation von sowohl A β 40 als auch IAPP zu blockieren.^[17,19]

Die IAPP-Segmente IAPP(8-18) und IAPP(22-28) sind die Hot-Spot-Segmente der IAPP-Selbstassoziationsfläche und dessen Heteroassoziationsfläche mit A β (Schema 1a).^[5,11,13] Die IAPP-Sequenz IAPP(8-28) bildet somit große Teile der IAPP-Fläche, die an diesen beiden Prozessen beteiligt ist. Daher könnten die beiden amyloidinduzierenden bzw. amyloidinhibierenden IAPP-Flächen Ähnlichkeiten aufweisen.^[11,15] Allerdings sind IAPP(8-28), IAPP(8-28)-GI oder jedes einzelne Hot-Spot-Segment nicht in der Lage, die A β 40-Amyloidogenese zu unterbinden.^[21] Dies deutet darauf hin, dass spezifische, bisher unbekannte strukturelle/topologische Merkmale der Hot-Spot-Segmente für die inhibitorische Funktion notwendig sind.^[21]

Hier stellen wir eine Strategie zum Entwurf einer Reihe von Mimetika der IAPP-Kreuzamyloid-Interaktionsfläche mit A β (ISMs) als hochpotente Inhibitoren der amyloidogenen Selbstassoziation von A β , IAPP oder beiden Polypeptiden vor (Schema 1b). Die Strategie beruht auf der kovalenten Verknüpfung von Hot-Spot-Segmenten und der Hypothese, dass das Verknüpfen von IAPP(8-18) und IAPP(22-28) miteinander mittels verschiedener strukturell voreingenommener Linkerelemente zu ISMs führen sollte, die unterschiedliche Strukturen und somit inhibitorische Funktionen aufweisen sollten. Um die intrinsische Amyloidogenität von IAPP(22-28) auszuschalten, wurde dieses Segment in seiner N-methylierten

Form eingesetzt.^[22] Da Amyloidstrukturen polymorph sind, haben wir erwartet, dass einige der Verknüpfungselemente im Vergleich zur nicht-inhibitorischen Struktur von IAPP(8-28) zur Stabilisierung von alternativen, amyloidähnlichen Strukturen führen würden.^[1,13] Einige dieser Strukturen könnten möglicherweise eine vorteilhafte Präorganisation von Resten der Interaktionsfläche, eine erhöhte Anzahl hydrophober Wechselwirkungen und eine ausgeprägte H-Brücken-bildende Kapazität quer über die Interaktionsfläche aufweisen. Solche Eigenschaften sollten zur inhibitorischen Funktion führen.^[1,14] Außerdem sollte die starke Neigung der ISMs zu Selbstassoziation und der erwartete Mangel an Amyloidogenität die Sequestrierung von A β oder IAPP in nicht-fibrilläre und nicht-toxische Heterooligomere bewirken.^[16,17,19]

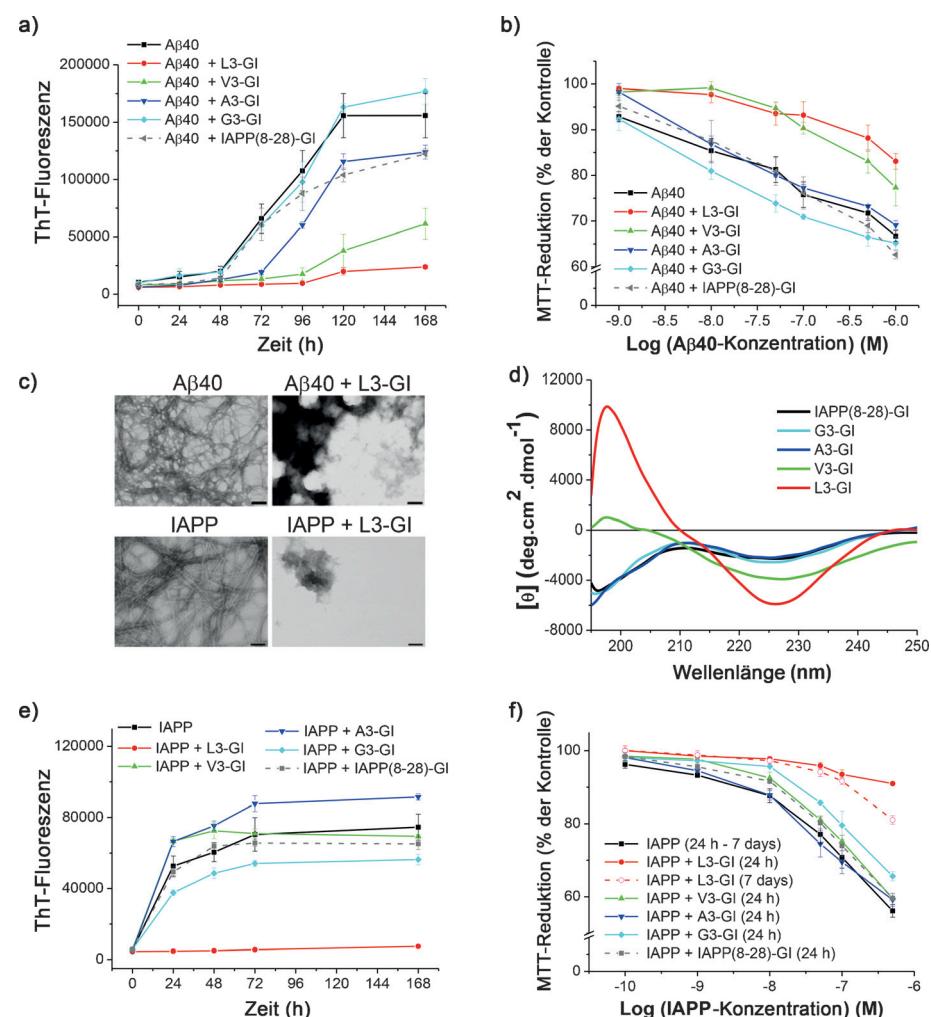


Abbildung 1. Effekte von G3-GI, A3-GI, V3-GI und L3-GI im Vergleich zu IAPP(8-28)-GI auf die A β 40- oder IAPP-Fibrillogenese und -Zytotoxizität und Konformationen der ISMs. a) Fibrillogenese von A β 40 (16.5 μ M) allein oder mit den Peptiden (1/1), bestimmt mittels ThT-Bindungsassay (Mittelwerte (\pm SEM), 3 Assays). b) Effekte auf die A β 40-Zytotoxizität. 7 Tage gealterte Lösungen (aus a) wurden zu den PC12-Zellen gegeben, und entstehender Zellschaden wurde mittels MTT-Reduktionsassay gemessen (Mittelwerte (\pm SEM), 3 Assays (je $n=3$)). c) TEM-Bilder von 7 Tage gealtertem A β 40 und dessen Mischung mit L3-GI (aus a) sowie von 7 Tage gealtertem IAPP und dessen Mischung mit L3-GI (aus e) (Maßstab: 100 nm). d) CD-Spektren der ISMs und von IAPP(8-28)-GI (5 μ M, pH 7.4). e) Fibrillogenese von IAPP (16.5 μ M) alleine oder mit den Peptiden (1/2), gemessen mittels ThT-Bindungsassay (Mittelwerte (\pm SEM), 3 Assays). f) Effekte auf die IAPP-Zytotoxizität. Die Lösungen aus (e) (1 oder 7 Tage gealtert) wurden zu RIN5fm-Zellen gegeben. Zellschaden wurde gemessen wie in (b) (Mittelwerte (\pm SEM), 3 Assays (je $n=3$)).

Um die Inhibitor-Designstrategie systematisch zu evaluieren, haben wir sechzehn ISMs entworfen und untersucht (Schema 1b, Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen). Die Linkerelemente waren, mit Ausnahme der ersten zwei ISMs, Tripeptidsegmente, die aus drei identischen Aminosäureresten bestanden (Schema 1b). Auf der Basis des Designkonzeptes sollten Linkerelemente, die hydrophobe β -Faltblattstruktur-propagierende Reste enthalten, in inhibitorischen ISMs resultieren; dementgegen sollten Linkerelemente, die aus kleinen oder polaren Resten bestehen, wie diejenigen, die in IAPP(19-21) und in β -Haarnadelschleifen/ β -Arcs vorkommen, nicht-inhibitorische ISMs ergeben.^[23,24]

Als erstes haben wir untersucht, inwiefern eine spezifische strukturelle Präorganisation der Hot-Spot-Segmente für die inhibitorische Funktion notwendig ist.^[21] Zu diesem Zweck wurden 8Aoc-GI und 8Adooc-GI synthetisiert, die die konformativ flexiblen Linkerelemente 8-Aoc (hydrophob) und 8-Adooc (hydrophil) enthalten (Schema 1b). In der Tat konnten diese beiden ISMs die Selbstassoziation von A β 40 oder IAPP nicht beinträchtigen, wie aus den Ergebnissen des Thioflavin T(ThT)-Bindungssassays und des 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid(MTT)-Reduktionsassays, der an der Ratten-Phäochromocytom-Zelllinie PC12 und der Ratten-Insulinom-RIN5fm-Zelllinie durchgeführt wurde, ersichtlich wurde (Abbildung S1). Als nächstes haben wir G3-GI, A3-GI, V3-GI und L3-GI synthetisiert (Schema 1b und Abbildung 1). L3-GI und V3-GI wiesen eine starke inhibitorische Wirkung auf die Fibrillogenese und Zelltoxizität von A β 40 (1/1) auf; dementgegen waren G3-GI, A3-GI und IAPP(8-28)-GI nicht in der Lage, diese Prozesse zu beeinträchtigen (Abbildung 1a-c). Die CD-Spektren von L3-GI und V3-GI wiesen auf große Anteile von β -Faltblatt-/ β -Haarnadelschleifenstruktur hin (Abbildung 1d).^[25] Im Gegensatz dazu deuteten die Spektren von A3-GI, G3-GI und IAPP(8-28)-GI auf signifikante Anteile ungeordneter Struktur zusätzlich zur β -Faltblatt-/ β -Haarnadelschleifenstruktur hin (Abbildung 1d).^[21] Darüber hinaus stellte sich heraus, dass L3-GI auch in der Lage ist, die Fibrillogenese und Zelltoxizität von IAPP zu blockieren (2-facher Überschuss),

wobei sich die anderen drei ISMs diesbezüglich als inaktiv erwiesen (Abbildung 1c,e,f). Diese Ergebnisse erbrachten den ersten Beweis für das Konzept.

Als nächstes synthetisierten wir die fünf ISMs I3-GI, Nle3-GI, 2Aoc3-GI, F3-GI und Cha3-GI, die hydrophobe Linkerelemente enthalten, und die vier ISMs K3-GI, Dap3-GI, R3-GI und KAc3-GI, die polare Linkerelemente enthalten (Schema 1b). Außerdem wurde als negative Kontrolle das ISM SpG-GI, das das β -Haarnadelschleifen-stabilisierende Dipeptid (d-Pro)Gly enthält und daher eine ähnliche Konformation wie IAPP(8-28)-GI annehmen sollte, synthetisiert.^[26] I3-GI, Nle3-GI, F3-GI, Cha3-GI und R3-GI blockierten die Fibrillogenese und Zelltoxizität von A β 40 (1/1), und TEM-Analyse zeigte, dass amorphe Aggregate die Hauptspezies in diesen Mischungen waren (Abbildung 2a,b)

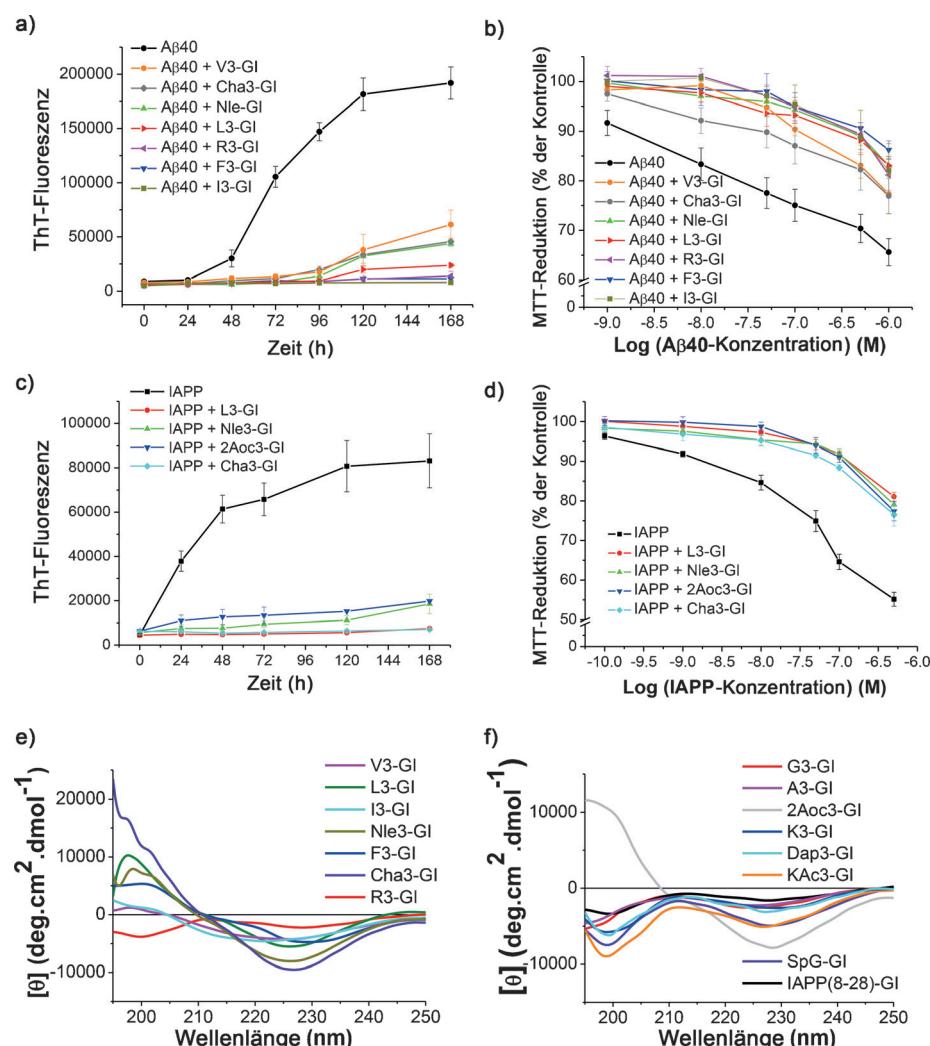


Abbildung 2. Inhibition der Amyloidogenese und Zelltoxizität von A β 40 oder IAPP durch verschiedene ISMs und Konformationen der ISMs. a) Fibrillogenese von A β 40 alleine oder mit ISMs (16.5 μ M; 1/1), bestimmt mittels ThT-Bindungssassay (Mittelwerte (\pm SEM), 3 Assays). b) Zelltoxizität von 7 Tage gealtertem A β 40 oder dessen Mischungen mit ISMs (aus a) (PC12-Zellen), gemessen mittels MTT-Reduktionsassay (Mittelwerte (\pm SEM), 3 Assays (je $n=3$)). c) Fibrillogenese von IAPP alleine oder mit ISMs (16.5 μ M; IAPP/ISM, 1/2), bestimmt mittels ThT-Bindungssassay (Mittelwerte (\pm SEM), je 3 Assays). d) Zelltoxizität von 7 Tage gealterten Lösungen von IAPP alleine oder dessen Mischungen mit ISMs (aus c), gemessen mittels MTT-Reduktionsassay (RIN5fm-Zellen) (Mittelwerte (\pm SEM), 3 Assays (je $n=3$)). e,f) CD-Spektren der A β 40-Inhibitoren (e) und Nicht-Inhibitoren (f) (5 μ M, pH 7.4).

und Abbildung S2). Dementgegen konnten alle anderen ISMs die Aggregation von $\text{A}\beta 40$ nicht beeinträchtigen (Abbildung S3). Erwähnenswert ist auch, dass die Selbstassoziation von $\text{A}\beta 40$ blockiert wurde, wenn die inhibitorischen ISMs (1/1) sowohl vor als auch nach ihrer Nukleation dazugegeben wurden (Abbildung S4). Vor allem zeigten Titrations von zelltoxischen $\text{A}\beta 40$ -Spezies mit inhibitorischen ISMs, dass die IC_{50} -Werte der inhibitorischen Effekte im unteren nanomolaren Bereich liegen (Tabelle 1). Darüber hinaus stellte sich heraus, dass Nle3-GI, Cha3-GI und 2Aoc3-GI in der Lage sind, die Fibrillogenese und Zelltoxizität von IAPP ebenfalls komplett zu blockieren (2/1) (Abbildung 2c,d). TEM zeigte, dass amorphe Aggregate die Hauptspezies in den ISM-IAPP-Mischungen waren (Abbildung S2). Im Gegensatz dazu waren alle anderen ISMs diesbezüglich ineffektiv (unveröffentlichte Daten). Ein wichtiger Befund ist auch, dass inhibitorische ISMs in der Lage waren, die IAPP-Fibrillogenese und IAPP-Zelltoxizität zu unterdrücken, sowohl wenn sie vor als auch wenn sie nach der Nukleation der Fibrillogenese dazugegeben wurden (Abbildung S4). Von noch größerer Bedeutung ist jedoch der Befund, dass alle erhaltenen IC_{50} -Werte im unteren nanomolaren Bereich liegen (Tabelle 1). Die Ergebnisse des MTT-Assays wurden durch Bestimmungen zum apoptotischen Zelltod bestätigt (Abbildung S5).^[16,17]

Die obigen Ergebnisse haben zur Identifizierung von drei ISMs (L3-GI, Nle3-GI, Cha3-GI) als Inhibitoren der Selbstassoziation von sowohl $\text{A}\beta 40$ als auch IAPP geführt. Weitere vier ISMs (V3-GI, I3-GI, F3-GI, R3-GI) wurden als $\text{A}\beta 40$ -selektive Inhibitoren und ein ISM (2Aoc3-GI) als IAPP-selektiver Inhibitor identifiziert. Erwähnenswert ist dabei auch der Befund, dass die Zielmolekül-Selektivität ($\text{A}\beta 40$ versus IAPP) der inhibitorischen ISMs bis zu einem mindestens 10-fachen molaren ISM-Überschuss erhalten blieb (Tabelle 1; unveröffentlichte Daten).^[16,17] Fernerhin erwiesen sich die ISMs als inaktiv gegenüber der Amyloidogenese von Lysozym, einem amyloidogenen Protein, das in keiner Beziehung zu $\text{A}\beta$ oder IAPP steht (Abbildung S6). Wie vom Designkonzept her erwartet, oligomeralisierten die ISMs im niedrigen mikro- bis submikromolaren Peptidkonzentrationsbereich und waren nicht-amyloidogen und nicht-zytotoxisch bis zum mindestens 100-fachen ihrer IC_{50} -Werte (Tabelle S2 und Abbildung S6).^[16] Darüber hinaus wiesen die ISMs im Gegensatz zu den Volllängen-IAPP-Analoga keine IAPP-Bioaktivität auf. Dies ergab sich ebenfalls aus ihrem Designkonzept, auf dessen Basis bestimmte Teile der

Tabelle 1: IC_{50} der inhibitorische Effekte der ISMs auf die zytotoxische Selbstassoziation von $\text{A}\beta 40$ und IAPP.

ISM	IC_{50} (\pm SEM) [nM] $\text{A}\beta 40$ -Inhibition ^[a]	IC_{50} (\pm SEM) [nM] IAPP-Inhibition ^{[a][b]}
V3-GI	186 (\pm 17)	n.d.
I3-GI	267 (\pm 7)	n.d.
L3-GI	81 (\pm 18)	55.4 (\pm 9.6)
Nle3-GI	189 (\pm 32)	40.5 (\pm 3.1)
F3-GI	123 (\pm 24)	n.d.
Cha3-GI	117 (\pm 29)	38.3 (\pm 8.8)
R3-GI	116 (\pm 11)	n.d.
2Aoc3-GI	n.d.	18.3 (\pm 1.4)

[a] IC_{50} s sind Mittelwerte (\pm SEM) aus 3 Titrationsassays (je $n=3$) ($\text{A}\beta 40$, 500 nM; IAPP, 100 nM).^[16,17] [b] n.d., nicht bestimmt (nicht-inhibitorische ISMs).

IAPP-Sequenz, die für die Bioaktivität notwendig sind, in den ISMs nicht vorhanden sind (Abbildung S6 und Text in den Hintergrundinformationen).^[16]

Die CD-Spektren aller inhibitorischen ISMs deuteten mit Ausnahme von R3-GI auf große Anteile von β -Faltblatt-/ β -

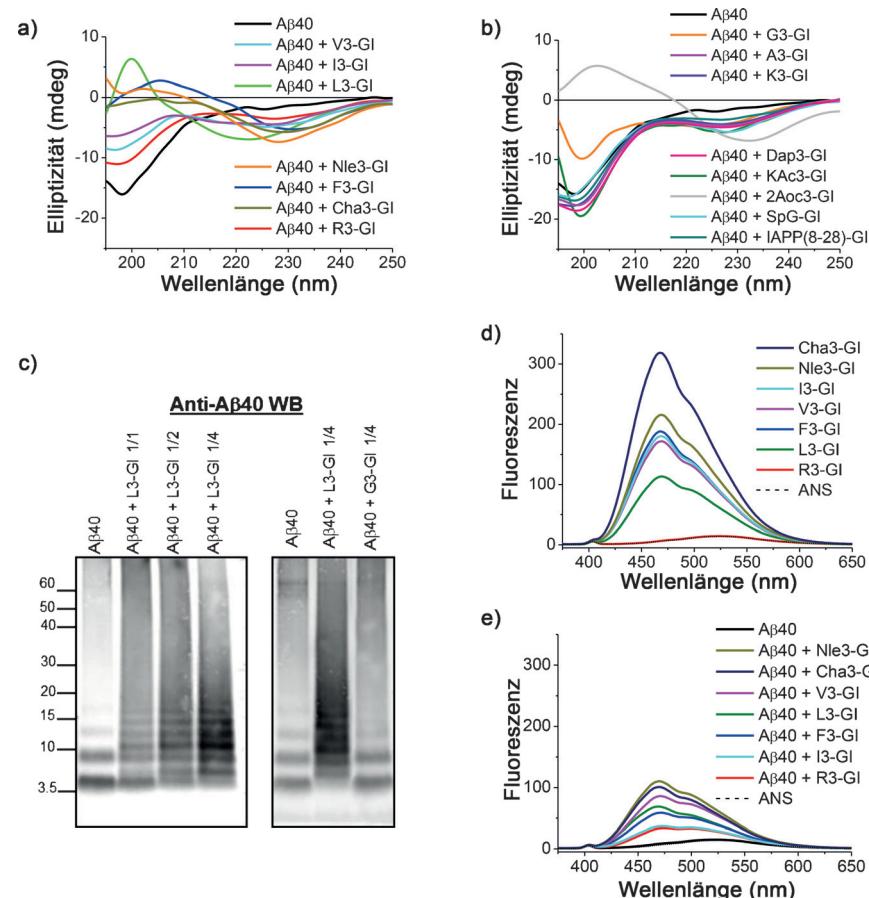


Abbildung 3: Charakterisierung der Wechselwirkungen der ISMs mit $\text{A}\beta 40$. a,b) CD-Spektren von $\text{A}\beta 40$ und dessen Mischungen (1/1) mit inhibitorischen (a) oder nicht-inhibitorischen ISMs (b) (5 μ M, pH 7.4). c) Charakterisierung der Heteroaggregate von $\text{A}\beta 40$ mit L3-GI oder G3-GI mittels Kreuzvernietzung mit Glutaraldehyd, NuPAGE und Western Blot-Analyse (WB) mit anti- $\text{A}\beta 40$ -Antikörper. d,e) Bestimmung der Oberflächenhydrophobie mittels 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure(ANS)-Bindungsassay. Fluoreszenzspektren von ANS allein und von dessen Mischungen mit inhibitorischen ISMs (d) oder Mischungen von inhibitorischen ISMs mit $\text{A}\beta 40$ (1/1) (e) (10 μ M, pH 7.4).

Haarnadelscheifenstruktur hin (Abbildung 2e,f für 2Aoc3-GI).^[25] Diese Annahme wurde durch die computerunterstützte Bestimmung der Sekundärstrukturanteile durch Dekonvolution der CD-Spektra untermauert. Die Ergebnisse dieser Analysen deuteten auf 80- bis 100%ige Anteile an β -Faltblatt-/ β -Haarnadelscheifenstruktur für alle inhibitorischen ISMs hin, außer für R3-GI, das 46% β -Faltblatt-/ β -Haarnadelschleifenstruktur und 54% ungeordnete Struktur aufwies (Tabelle S3).^[27-28] NMR-Untersuchungen an R3-GI deuteten auf die Anwesenheit von β -Haarnadelschleifenähnlichen Populationen hin (Abbildung S7 und Text in den Hintergrundinformationen). Schließlich wiesen die CD-Spektren der nicht-inhibitorischen ISMs zusätzlich zur β -Faltblatt-/ β -Haarnadelschleifenstruktur auf signifikante Anteile an ungeordneten Strukturen hin (Abbildung 2f und Tabelle S3).

Als nächstes untersuchten wir die Wechselwirkungen der ISMs mit $\text{A}\beta 40$ oder IAPP (Text in den Hintergrundinformationen). Es stellte sich heraus, dass inhibitorische ISMs präfibrilläre $\text{A}\beta 40$ -Spezies mit einer Affinität binden, die in den meisten Fällen im nanomolaren Bereich ist. Diese Wechselwirkungen führten zu nicht-fibrillären Hetero-Oligomeren, die große Mengen an β -Faltblatt-/ β -Haarnadelschleifenstruktur und exponierte hydrophobe Bereiche aufwiesen (Abbildung 3, Tabelle S4 und Abbildungen S8 und S9). Dementgegen wiesen die Hetero-Aggregate der nicht-inhibitorischen ISMs mit $\text{A}\beta 40$ mit Ausnahme von 2Aoc-GI große Anteile an ungeordneter Struktur und keine exponierten hydrophoben Bereiche auf (Abbildung 3b,d, Tabelle S4 und Abbildungen S9–S11). Ähnliche Ergebnisse erhielten wir aus den Untersuchungen der Wechselwirkungen der ISMs mit IAPP (Tabelle S4 und Abbildungen S12 und S13). Die inhibitorische Funktion der ISMs scheint somit durch hochaffine Wechselwirkungen von β -faltblattreichen ISMs, die große Mengen an exponierten hydrophoben Bereichen enthalten, an präfibrilläre $\text{A}\beta 40$ - oder IAPP-Spezies herbeigeführt zu werden. In der Tat deuten unsere Befunde darauf hin, dass durch obige Wechselwirkungen $\text{A}\beta 40$ oder IAPP in Form von amorphen und nicht-toxischen Heteroaggregaten aus ihrem amyloidogenen Selbstassoziationsweg sequestriert werden.^[1]

Die Ergebnisse einiger Untersuchungen deuten darauf hin, dass die „Kreuznukleation“ der IAPP-Amyloidogenese durch $\text{A}\beta$ -Fibrillen eine molekulare Verbindung zwischen AD und T2D darstellen könnte.^[7,8] Da die ISMs, die die Selbstassoziation von IAPP blockieren, auch an $\text{A}\beta 40$ binden, haben wir uns gefragt, inwiefern sie auch mit dem Kreuznukleationsprozess interferieren könnten. In der Tat stellte sich heraus, dass sie die durch $\text{A}\beta 40$ ausgelöste Nukleation der IAPP-Amyloidogenese effektiv unterdrücken können (Abbildung 4a,b und Abbildung S14).

Von großer Bedeutung ist darüber hinaus der Befund, dass alle ISMs, die die Selbstassoziation von

$\text{A}\beta 40$ blockierten, auch in der Lage waren, mit einer Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich $\text{A}\beta 42$, ein pathophysiologisch relevantes Schlüsselmolekül der AD, zu binden, und dessen Fibrillogenese und Zelltoxizität zu blockieren (1/1) (Abbildung 4c,d, Tabelle S5, Abbildung S15 und Text in den Hintergrundinformationen).^[11] Schließlich ergab sich aus elektrophysiologischen Untersuchungen in frisch präparierten Maushirnschnitten, dass R3-GI die Beeinträchtigung der hippocampalen synaptischen Langzeit-Potenzierung (LTP), die durch die Aggregation von sowohl $\text{A}\beta 40$ als auch $\text{A}\beta 42$ hervorgerufen wird, unterbinden kann. Diese letzteren, ex vivo gewonnenen Ergebnisse unterstreichen die physiologische Relevanz der In-vitro-Ergebnisse (Abbildung 4e und Abbildung S16).^[29]

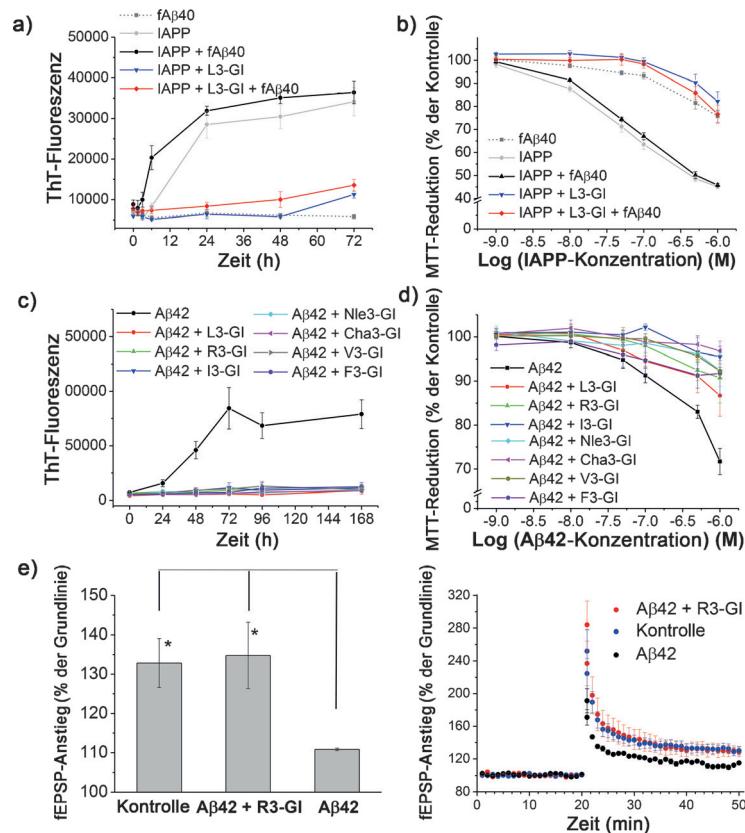


Abbildung 4. Inhibitorische Effekte der ISMs auf die Kreuznukleation der IAPP-Fibrillogenese durch $\text{A}\beta 40$ -Fibrillen (f $\text{A}\beta 40$) und auf die $\text{A}\beta 42$ -Fibrillogenese und $\text{A}\beta 42$ -Zelltoxizität. a,b) Inhibition der mit f $\text{A}\beta 40$ (10%) herbeigeführten Kreuznukleation der IAPP-Fibrillogenese (12 μM) (a) und IAPP-Zytotoxizität (b) durch L3-GI (5-fach), bestimmt mittels ThT-Bindungsassay (Mittelwerte (\pm SEM), 4 Assays) (a) und mittels MTT-Reduktionsassay (b) (24 h gealterte Lösungen aus a) (RIN5f-Zellen) (Mittelwerte (\pm SEM), 4 Assays ($\text{j}e n=3$)). c,d) Inhibitorische Effekte der ISMs (1/1) auf die $\text{A}\beta 42$ -Fibrillogenese (16.5 μM), bestimmt mittels ThT-Bindungsassay (Mittelwerte (\pm SEM), 3 Assays) (c), und auf die $\text{A}\beta 42$ -Zytotoxizität (d) (7 Tage gealterte Lösungen aus c), bestimmt mittels MTT-Reduktion (PC12-Zellen) (Mittelwerte (\pm SEM), 3–4 Assays ($\text{j}e n=2-3$)). e) Unterbindung der durch $\text{A}\beta 42$ hervorgerufenen Beeinträchtigung der hippocampalen LTP in akuten Hippocampus-Hirnschnitten der Maus mittels R3-GI. Links: LTP in der Gegenwart von $\text{A}\beta 42$ (50 nM), $\text{A}\beta 42 + \text{R3-GI}$ (1/10) oder R3-GI allein (500 nM) (Kontrolle) (Mittelwert aus den letzten 5 min der Messungen (\pm SEM), $n=6$). Signifikante Effekte (*) für $\text{A}\beta 42$ im Vergleich zur Mischung oder der Kontrolle ($p<0.05$, $n=6$) (ungepaarter t-Test). Rechts: Zeitverlauf der synaptischen Transmission (Mittelwerte (\pm SEM), $n=6$).

Zusammenfassend stellen wir in diesem Bericht eine neue Segmentverknüpfungsstrategie für den Entwurf Peptid-basierter Mimetika der IAPP-Kreuzamyloid-Interaktionsfläche mit A β als hochpotente Inhibitoren der zytotoxischen Selbstassoziation von A β 40(42), IAPP oder beiden Polypeptiden vor. Ein Alleinstellungsmerkmal dieses Ansatzes ist es, dass die Natur des Verknüpfungselements die ISM-Struktur und ihre inhibitorische Funktion bestimmen, bezüglich sowohl Inhibitorpotenz als auch Zielmolekül-Selektivität. Es ist uns gelungen, drei nanomolare Inhibitoren der zytotoxischen Selbstassemblierung von sowohl A β 40 wie auch IAPP zu identifizieren. Hinzu kommen vier nanomolare Inhibitoren der zytotoxischen A β 40-Selbstassemblierung sowie ein nanomolarer IAPP-Inhibitor. Diese ISMs gehören somit zu den potentesten Inhibitoren der zytotoxischen Selbstassoziation von A β 40 oder IAPP, die bis dato entwickelt wurden.^[3] Zudem waren es bisher nur IAPP-GI und verwandte „Volllängen“-IAPP-Analoga, die nanomolares Inhibitionspotenzial gegenüber sowohl A β 40 als auch IAPP aufwiesen.^[16,17,19] Im Vergleich weisen die ISMs nur die Hälfte der Moleküllänge auf und haben keine IAPP-Bioaktivität. Letzteres ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von Amyloidinhibitoren für die AD. Darüber hinaus sind die IAPP-inhibitorischen ISMs die ersten Inhibitoren der Kreuznukleation der IAPP-Fibillogenese. Weiterhin blockieren alle sieben A β 40-inhibitorischen ISMs ebenfalls die zytotoxische Selbstassoziation von A β 42. Somit könnten die ISMs vielversprechende Leitstrukturen für Moleküle werden, mit denen man pathologische Proteinaggregationsprozesse bei AD und/oder T2D hemmen könnte.^[1,3,19] Vor allem aber bietet das hier vorgestellte ISM-Designkonzept eine einfache chemische Strategie, um die Struktur von initial nicht-inhibitorischen (Kreuz-)Amyloid-Interaktionsflächen zu kontrollieren und diesen Molekülbereichen potente Selbst- und/oder Kreuzamyloid-inhibitorische Funktionen zu verleihen. In der Tat stellt die Ausbildung von β -Faltblatt-Interaktionsflächen einen frühen Schritt bei der Amyloid-Selbstassemblierung und anderen Protein-Protein-Wechselwirkungen dar. Ähnliche Interaktionsflächen werden häufig in der Homo- und Heteroassoziation eingesetzt. Daher sollte unser Ansatz in der Entwicklung von potennten Inhibitoren sowohl der Amyloid-Selbstassoziation wie auch der pathogenen Wechselwirkungen anderer Proteine Anwendung finden können.^[1,13–15]

Danksagung

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG; SFB 1035/B06) gefördert. Wir danken V. Ecker, K. Hille und H. Scheler für technische Hilfe, A. Kastenmüller, M. Hanzlik und S. Weinkauf für Unterstützung bei der TEM-Analyse und J. Bernhagen für wertvolle Diskussionsbeiträge.

Stichwörter: Alzheimer-Krankheit · Amyloidinhibitoren · Inselamyloid-Polypeptid · Protein-Protein-Wechselwirkungen · β -Amyloid-Peptid

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13095–13100
Angew. Chem. **2015**, *127*, 13287–13292

- [1] D. Eisenberg, M. Jucker, *Cell* **2012**, *148*, 1188–1203.
- [2] P. Westermark, *FEBS J.* **2005**, *272*, 5942–5949.
- [3] T. Hård, C. Lendel, *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 441–465.
- [4] R. Kayed, J. Bernhagen, N. Greenfield, K. Sweimeh, H. Brunner, W. Voelter, A. Kapurniotu, *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 781–796.
- [5] L. E. Buchanan, E. B. Dunkelberger, H. Q. Tran, P. N. Cheng, C. C. Chiu, P. Cao, D. P. Raleigh, J. J. de Pablo, J. S. Nowick, M. T. Zanni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 19285–19290.
- [6] K. Akter, E. A. Lanza, S. A. Martin, N. Myronuk, M. Rua, R. B. Raffa, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *71*, 365–376.
- [7] B. O’Nuallain, A. D. Williams, P. Westermark, R. Wetzel, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17490–17499.
- [8] M. E. Oskarsson, J. F. Paulsson, S. W. Schultz, M. Ingesson, P. Westermark, G. T. Westermark, *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 834–846.
- [9] K. Jackson, G. A. Barisone, E. Diaz, L. W. Jin, C. DeCarli, F. Despa, *Ann. Neurol.* **2013**, *74*, 517–526.
- [10] J. Miklossy, H. Qing, A. Radenovic, A. Kis, B. Vileno, F. Laszlo, L. Miller, R. N. Martins, G. Waeber, V. Mooser, F. Bosman, K. Khalili, N. Darbinian, P. L. McGeer, *Neurobiol. Aging* **2010**, *31*, 1503–1515.
- [11] E. Andreetto, L. M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, R. Frank, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3081–3085; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3146–3151.
- [12] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16742–16747.
- [13] J. J. Wiltzius, S. A. Sievers, M. R. Sawaya, D. Eisenberg, *Protein Sci.* **2009**, *18*, 1521–1530.
- [14] S. Pechmann, E. D. Levy, G. G. Tartaglia, M. Vendruscolo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 10159–10164.
- [15] V. Castillo, S. Ventura, *PLoS Comput. Biol.* **2009**, *5*, e1000476.
- [16] L. M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, A. Kazantzis, A. Kapurniotu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2046–2051.
- [17] L. M. Yan, A. Velkova, M. Tatarek-Nossol, E. Andreetto, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1246–1252; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1268–1274.
- [18] W. Q. Qiu, H. Zhu, *Front. Aging Neurosci.* **2014**, *6*, 186.
- [19] L. M. Yan, A. Velkova, M. Tatarek-Nossol, G. Rammes, A. Sibaev, E. Andreetto, M. Kracklauer, M. Bakou, E. Malideli, B. Goke, J. Schirra, M. Storr, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10378–10383; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 10569–10574.
- [20] F. Meng, D. P. Raleigh, A. Abedini, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14340–14342.
- [21] E. Andreetto, L. M. Yan, A. Caporale, A. Kapurniotu, *Chem-BioChem* **2011**, *12*, 1313–1322.
- [22] A. Kapurniotu, A. Schmauder, K. Tenidis, *J. Mol. Biol.* **2002**, *315*, 339–350.
- [23] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 251–276.
- [24] A. V. Kajava, U. Baxa, A. C. Steven, *FASEB J.* **2010**, *24*, 1311–1319.
- [25] R. W. Woody in *The Peptides, Analysis, Synthesis Biology*, Vol. 7 (Hrsg.: S. Udenfriend, J. Meienhofer, V. Hruby), Academic Press, New York, **1985**, S. 15–114.
- [26] J. F. Espinosa, S. H. Gellman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2330–2333; *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2420–2423.
- [27] N. J. Greenfield, *Nat. Protoc.* **2007**, *1*, 2876–2890.
- [28] S. W. Provencher, J. Glockner, *Biochemistry* **1981**, *20*, 33–37.
- [29] T. Ma, E. Klann, *J. Neurochem.* **2012**, *120*(Suppl. 1), 140–148.

Eingegangen am 1. Juni 2015

Online veröffentlicht am 4. September 2015