

3. Zusammenfassung

Die Assoziation von β -Faltblattstrukturen unter Ausbildung pathogener, fibrillärer Proteinaggregate (Amyloide) steht im Zusammenhang mit einer Reihe degenerativer Erkrankungen wie z.B. Alzheimer, Prion-Erkrankungen oder Diabetes Typ II. Systematische Studien zum konformationellen Verhalten und zum Mechanismus der Assoziation/Aggregation der pathogenen β -Faltblattstrukturen sind aufgrund der extremen Unlöslichkeit solcher Sequenzen erschwert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden wasserlösliche Modellpeptide [DPKGDPKG-(VT)_n-GKGDPKPD, n=3-8] mit einer differenzierten Fähigkeit zur Ausbildung intermolekularer β -Faltblattstrukturen detailliert analysiert. Die Peptide bestehen aus einer zentralen Valin-Threonin-Domäne, die durch eine hohe Tendenz zur Ausbildung amphipathischer β -Faltblattstrukturen charakterisiert ist, und unstrukturierten N- und C-terminalen Oktapeptidsequenzen, die aufgrund ihrer Hydrophilie die Wasserlöslichkeit der Peptide vermitteln. Mit Hilfe dieser Modellpeptide wurden erstmalig die Zusammenhänge zwischen der Bildung und Stabilität von β -Faltblattstrukturen, deren Assoziationsverhalten und der Bildung amyloider Strukturen beschrieben.

Über Konformationsuntersuchungen wurde ein unterschiedliches Potential der Peptide zur Ausbildung von β -Faltblattstrukturen nachgewiesen. Während kurze Peptide mit drei und vier VT-Paaren (VT3 und VT4) in wässriger Lösung unstrukturiert vorliegen, bilden Modellpeptide mit sechs bis acht VT-Paaren (VT6, VT7, VT8) antiparallele β -Faltblattstrukturen, deren Stabilität mit der Länge der VT-Domäne steigt. Die hohe Stabilität der ausgebildeten Sekundärstruktur konnte durch Denaturierungsuntersuchungen (Guanidiniumhydrochlorid, Temperatur) bestätigt werden. Für das Modellpeptid VT5 wurde in wässriger Lösung ein konzentrationsabhängiger Übergang vom ungeordneten in den β -faltblattstrukturierten Zustand nachgewiesen. Dieses Peptid ist im Unterschied zu den Peptiden in stabilen β -Faltblattstrukturen durch eine Veränderung der Lösungsumgebung (TFE, SDS) konformationell beeinflussbar ("Switch"-Peptid). Durch den Einbau Sekundärstrukturstörender D-Aminosäuren können β -Faltblattstrukturen (VT6) destabilisiert werden. Mit Hilfe eines systematischen Doppel-D-Aminosäure-Substitutionssets gelingt es daher assoziierende β -Faltblattstrukturen, die NMR-Untersuchungen nicht zugänglich sind, hinsichtlich ihrer Lage in der Sequenz zu analysieren. Da der strukturstörende Einfluß der

D-Aminosäuren sich mit der Ausdehnung und Stabilisierung der β -Faltblattstruktur-Domäne (VT7, VT8) stark abschwächt, bleibt diese Lokalisierungsmethode, die bereits erfolgreich bei α -Helices eingesetzt wurde, in ihrem Einsatz auf kurze β -Faltblattstrukturen beschränkt.

Es wurde gezeigt, daß das Assoziationsverhalten der Peptide mit der Stabilität der β -Faltblattstruktur korreliert. Während unstrukturierte Peptide (VT3 und VT4) in wäßriger Lösung monomer vorliegen, setzt die Peptidassoziation mit der Herausbildung von β -Faltblattstrukturen ein. Mit steigender Stabilität der β -Faltblattstruktur vom VT5 zum VT8 werden Assoziate mit einem Molekulargewicht von 550 bis über 2000 kDa gebildet. Dabei bleiben selbst die hochmolekularen Komplexe wasserlöslich, was auf die hydrophilen, terminalen Oktapeptidsequenzen zurückzuführen ist. Der konformationelle Einfluß der D-Aminosäuren bestätigt sich im Assoziationsverhalten. Während eine effiziente Störung der β -Faltblattstrukturierung (VT6) die Assoziation signifikant herabsetzt, ist das Assoziationsverhalten der ausgedehnten Domänen (VT7 und VT8) nur geringfügig beeinträchtigt. Die Assoziation der Peptide ist mit einer gerichteten Aneinanderlagerung der β -Stränge verbunden, die zur Ausbildung hochgeordneter, fibrillärer Strukturen führt. Die Fibrillen weisen Gemeinsamkeiten mit natürlich vorkommenden Amyloid-Fibrillen auf. Es wurde festgestellt, daß die hochassoziierenden D-Aminosäure-Analoga die besseren Amyloid-Bildner sind.

Einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit bildeten Untersuchungen zur Konformation und Assoziation des Alzheimer-Peptides A β (1-42):

DAEFRHDSGY¹⁰EVHHQKLVFF²⁰AEDVGSNKG³⁰IIGLMVGGV⁴⁰IA.

Der strukturelle Übergang des Peptides von einer löslichen, monomeren Form in eine assoziierende, β -faltblattstrukturierte Konformation wird als initialer Schritt für die Bildung pathogener Amyloid-Fibrillen angesehen. Zur Erkennung struktursensitiver Bereiche innerhalb der A β (1-42)-Sequenz, die einen Strukturwechsel des Peptides auslösen, wurden positionsspezifische Strukturstörungen über ein komplettes D-Aminosäure-Substitutionsset vorgenommen. D-Aminosäuren rufen eine lokale Störung von Sekundärstrukturen hervor, ohne andere Eigenschaften des Peptides zu ändern. Damit gestatten sie die Untersuchung konformationeller Veränderungen im A β ohne die Hydrophobie des Peptides zu beeinflussen. Da A β in wäßriger Lösung eine ausgeprägte Assoziationstendenz aufweist, wurden die Studien zur Stabilisierung einer löslichen Form des Peptides in 80% TFE/20% Wasser (v/v) durchgeführt. Obwohl A β (1-42) unter diesen Bedingungen in zwei separate Helices faltet,

löst nur die Destabilisierung der Helix I (11-24) den Übergang in eine β -Faltblattstruktur aus. Der konformationelle $\alpha \rightarrow \beta$ Übergang ist dabei direkt mit der Aggregation des Peptides in Amyloid-Fibrillen verbunden. Den größten Einfluß auf die Auslösung des Strukturwechsels haben die in der hydrophoben Region des Peptides lokalisierten Aminosäurereste ¹⁷LVFFAED²⁴V, d.h. sowohl konformationelle Veränderungen als hydrophobe Wechselwirkungen sind wichtige Triebkräfte für die Auslösung der Amyloid-Bildung des Alzheimer-Peptides. Die Schlüsselrolle dieser zentralen Domäne für den Assoziationsprozeß von A β ist bereits beschrieben worden. Die vorliegenden Ergebnisse weisen jedoch zum ersten Mal am Gesamtmolekül nach, daß die konformationelle Stabilität dieser Region direkt den Strukturübergang des Alzheimer-Peptides steuert. Es kann daher vermutet werden, daß der Einfluß verschiedenster Parameter auf die Amyloid-Bildung des Alzheimer-Peptides (pathologische Chaperone, Metallionen, Mileuänderungen, A β -Modifikationen, etc.) auf eine Änderung der Stabilität der zentralen Helix (11-24) von A β zurückzuführen ist.