

4. Experimenteller Teil

4.1. Chemikalien

Aldrich (Deisenhofen, Deutschland): α -Cyano-4-hydroxymizsäure, Piperidin, Sinapinsäure, Thioflavin T

Fluka (Buchs, Schweiz): Diisopropylethylamin; Dichlormethan, Dimethylformamid, Trifluoressigsäure

Merck (Darmstadt, Deutschland): Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, Natriumchlorid, Natriumdodecylsulfat, Kongo Rot, Piperidin, Phenol, Uranylacetat, Guanidinhydrochlorid

Novabiochem (Bad Soden, Deutschland): Fmoc-geschützte Aminosäuren

T.J. Baker: (Phillipsburg, USA) Acetonitril, Ethanol, Diethylether, 2,2,2-Trifluorethanol, 2,2,2-Trifluorethanol- d_2 -OH, 2,2,2-Trifluorethanol- d_3

Rapp Polymer (Tübingen, Deutschland): TentaGel Harze

HBTU und HOBt wurden am FMP hergestellt.

4.2. Methoden

4.2.1. Automatische Peptidsynthese

Alle Peptide wurden mittels Festphasensynthese (Merrifield, 1963) und Fmoc-Strategie (Chang & Meienhofer, 1978) hergestellt. Die Synthesen erfolgten am MilliGen 9050 Peptidsyntheseautomat (Milligen/Biosearch, Burlington, MA) unter den in Tabelle 10 beschriebenen Bedingungen. Die Abspaltung der Peptide vom Harz bei gleichzeitiger Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte entsprechend Tabelle 10. Die Lösung vollständig deblockierter Peptide wurden durch Filtration vom Harz getrennt, aus dem Filtrat mit Diethylether gefällt, filtiert und gewaschen.

Tabelle 10. Bedingungen der automatischen Peptidsynthese und Harzabspaltung

Peptid	VT-Peptide	A β -Peptide	iA β 5
Harz	TentaGel S RAM 0,24 mmol/g (0,5 g)	TentaGel S Ac 0,2 mmol/g (0,5 g)	TentaGel S Ac 0,2 mmol/g (0,5 g)
Fmoc-Aminosäuren	1 mmol	1 mmol	1 mmol
Kupplungen ¹	a) einfach: Oktapeptide, 20 min b) doppelt: VT-Bereich, 2 x 20 min	einfach: 20 min ²	einfach: 20 min
Kupplungsreagenz	1 mmol HBTU/ 1 mmol HOBt ³	1 mmol HBTU/ 1 mmol HOBt	1 mmol HBTU/ 1 mmol HOBt
Deblockierung	20% Piperidin in DMF ⁴ , 10min	a) 2% DBU/20% Piperidin in DMF ⁵ b) 20% Piperidin/DMF ⁶ , 10 min	20% Piperidin in DMF, 10 min
Base	2 mmol DIEA ⁷	2 mmol DIEA	2 mmol DIEA
Peptidharzspaltung	5% Wasser in TFA, 3h	5% Wasser, 5 % Phenol, 2% Triisopropylsilan in TFA, 3h	5% Wasser, 5 % Phenol, 2% Triisopropylsilan in TFA, 3h

¹ Startkonzentration der Fmoc-Aminosäuren: 0,3 M, ² Zur Kupplung von Alanin 42 an das TentaGel S Ac Harz wurden 0,5 mmol Aminosäure mit 0,5 mmol Diisopropylcarbodiimid und 0,4 mmol N-Methylimidazol in Dichlormethan für 2h gekuppelt, ³ 1-Hydroxybenzotriazol, ⁴ Dimethylformamid, ⁵ im Aminosäurebereich: Ala42-Lys28, ⁶ im Aminosäurebereich: Asn27-Asp1; ⁷ Diisopropylethylamin

4.2.2. Manuelle Peptidsynthese

Aufgrund des Auftretens von Fehlsequenzen, die mit der starken Assoziationsneigung β -Faltblattstruktur-bildender Peptide zusammenhängen, wurden VT7 und VT8 vom C-Terminus aus nur bis einschließlich zum 6. VT-Paar am Peptidsyntheseautomaten aufgebaut (Harz-DPKPDGKGTVTVTVTVTVTV-Fmoc). Anschließend wurde manuell synthetisiert.

Überprüfung der Vollständigkeit der Kupplung

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Synthese am Automaten sowie der nachfolgenden manuellen Syntheseschritte wurden MALDI-MS-Untersuchungen und Nachweis für Aminogruppen nach Kaiser (Kaiser *et al.* 1970) durchgeführt.

Für die MS-Experimente wurden einige Harzkugel entnommen, mit Ethanol gewaschen und mit 5% Wasser in TFA versetzt, um das Fmoc-geschützte Peptid vom Harz und die Seitenkettenschutzgruppen abzuspalten. 10 µl dieser Lösung wurden mit 20 µl Sinapinsäure-Matrix vermischt und nach der Co-Kristallisation mittels MALDI-MS untersucht (vgl. 4.2.4.).

Für den "Kaiser"-Test wurden einige Harzkugeln entnommen, mit Ethanol gewaschen und mit je zwei Tropfen der folgenden Lösungen versetzt:

- 5 g Ninhydrin, gelöst in 20 ml Ethanol

- 80 g Phenol, gelöst in 20 ml Ethanol/2 ml einer 1 mM wässrigen KCN-Lösung, verdünnt mit 98 ml Pyridin.

Nach guter Durchmischung wird der Ansatz 5 min in einen auf 120°C geheizten Trockenschrank gestellt. Eine Blaufärbung zeigt freie primäre Aminogruppen und somit eine unvollständige Kupplung der letzten geschützten Aminosäure an.

Beladungsbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung der Beladung wurden 1 g des Fmoc-geschützten Peptidharzes mit 10 ml 20% Piperidin/80% DMF versetzt und 15 min gerührt. 100 µl der Abspalllösung wurde 1:100 mit 20% Piperidin/80% DMF verdünnt und die Extinktion (E) bei 301 nm (Absorptionsmaximum des Dibenzofulvens) bestimmt. Aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz ergibt sich bei einer Schichtdicke von 1 cm die erreichte Beladung (mmol/g):

$$\text{Beladung} = \frac{E \cdot 10 \cdot 100}{\epsilon}. \quad (5)$$

Synthese

Zur ersten manuellen Kupplung (Fmoc-Thr-(tBu)-OH) wurden jeweils 1 mmol Aminosäure, HOBt und Diisopropylcarbodiimid in 50% DMF/50% Dichlormethan verwendet. Die Kupplungsdauer betrug 2 Stunden.

Die Kupplung der weiteren Fmoc-Aminosäuren erfolgte analog zur automatischen Synthese mit jeweils 1 mmol Aminosäure, HBTU und HOBt sowie 2 mmol DIEA.

Nachdem die Kupplung der VT-Sequenz und der ersten Aminosäure der Oktapeptidsequenz (Glycin) erfolgreich abgeschlossen waren, wurde die Peptidsynthese am Automaten fortgesetzt.

4.2.3. Reinigung der Peptide

Die Rohpeptide wurden durch präparative RP-HPLC unter Verwendung einer PolyEncap Säule A300, 10 μm , 250 x 20 mm i.d. (Bischoff Analysentechnik GmbH, Leonberg) an einem Shimadzu HPLC System (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg), bestehend aus zwei LC-8A Pumpen, einem SPD-6A UV-Detektor (220 nm) und einem SCL-8A System Controller, gereinigt. Die Flußrate betrug 10 ml/min. Es wurden dazu 80-100 mg Rohpeptid in 5% ACN/Wasser-0,1% TFA gelöst, über eine 2 ml Schleife injiziert und mittels eines ACN-Gradienten in 0,1% wäßriger TFA getrennt (Tabelle 11). Aufgrund der hohen Assoziationsneigung β -faltblattstrukturierter Peptide, die mit einer starken Peakverbreiterung auf der hydrophoben RP-Chromatographiesäule einhergeht, wurde zur Peakbreitenverringerng bei 85°C chromatographiert (Tabelle 11). Die Identität und Reinheit der separierten Peptidfraktionen wurde mittels MALDI-Massenspektrometrie und HPLC (Bedingungen siehe 4.2.4.) bestimmt. Einheitliche Fraktionen wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer eingengt und lyophilisiert.

Tabelle 11. Gradientensysteme und Temperatur bei der chromatographischen Peptidreinigung

Peptid	Gradient ¹	Temperatur
VT3, VT4	5-35% B in 70 min	Raumtemperatur
VT5	5-40% B in 70 min	Raumtemperatur
VT6, VT6-Substitutionsset	10-60% B in 70 min	Raumtemperatur
VT7, VT8, VT7-DD, VT8-DD	20-80% B in 70 min	85°C
A β (1-42)-Substitutionsset	20-80% B in 70 min	85°C
iA β 5	5-45% B in 70 min	Raumtemperatur

¹Eluent A: 0,1% TFA in Wasser, Eluent B: 0,1% TFA in 80% ACN/20% Wasser

4.2.4. Analytische Charakterisierung der Peptide

Die Charakterisierung der Peptide erfolgte mittels Massenspektrometrie, analytischer HPLC und Aminosäureanalyse (Tabellen 12-14)

Die ESI-MS-Untersuchungen wurden an einem TSQ 700, Finnigan MAT 95 Gerät durchgeführt. Die lyophilisierten Peptide wurden in 50% ACN/50% Wasser-1% Essigsäure gelöst. Typische ESI-Bedingungen waren 4,5 kV ESI-Spannung, 200°C Kapillartemperatur und ein 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ -Fluß.

MALDI-Untersuchungen wurden an einem Kratos Analytical Kompakt MALDI II Gerät durchgeführt. Als Matrix wurden 10 mg/ml Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure) in 66% Wasser/34% ACN-0,1% TFA oder gesättigte α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure in 50% ACN/50% Wasser-0,3% TFA genutzt.

Die Bestimmung der HPLC-Reinheit der Peptide wurde unter Verwendung einer PolyEncap Säule A300, 8 μ m, 250 x 4 mm, i.d. (Bischoff Analysetechnik GmbH, Leonberg) an einem Shimadzu LC10 HPLC-System, bestehend aus zwei LC10-AD Pumpen, einem SIL-10A Autoinjektor und einem SPD-M10A Diodenarray-Detektor (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg) sowie an einer Jasco HPLC Anlage mit As-950 Autoinjektor, zwei PU-980 Pumpen und einem UV-975 Detektor durchgeführt. Der Fluß betrug 1ml/min. Es wurde ein linearer Gradient genutzt: 5-95% B in 40 min (Eluent A: 0,1% TFA in Wasser, Eluent B: 0,1% TFA in 80% ACN/20% Wasser).

Zur Bestimmung der Peptidgehalte stand ein LC 3000-Aminosäureanalysator (Biotronik-Eppendorf, Maintal, Deutschland) auf der Basis von Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin zur Verfügung. Die Peptide wurden in 6 N HCl bei 110-120°C für 24-48h hydrolysiert.

Tabelle 12. Ergebnisse der ESI-MS-Untersuchungen und HPLC-Gehaltsbestimmungen der (VT)_n-, (VT)_n-DD-Peptide und des Peptides iA β 5

Peptid	Sequenz ¹	[M+H] ⁺ _{ber.} ² (Da)	[M+H] ⁺ _{besti.} (Da)	Reinheit (%)
VT3	DPKGDPKGVTVTVT GKGDPKPD-NH ₂	2208,5	2208,3	96,3
VT4	DPKGDPKGVTVTVTVT GKGDPKPD-NH ₂	2408,7	2408,4	95,3
VT5	DPKGDPKGVTVTVTVTVT GKGDPKPD-NH ₂	2609,0	2608,7	94,3
VT6	DPKGDPKGVTVTVTVTVTVT . . . GKGDPKPD-NH ₂	2809,2	2809,2	95,3
VT7	DPKGDPKGVTVTVTVTVTVTVT . . GKGDPKPD-NH ₂	3009,4	3009,6	87,5
VT8	DPKGDPKGVTVTVTVTVTVTVTVTVTGKGDPKPD-NH ₂	3209,7	3209,8	86,2
VT6-DD	vgl. Tabelle 13: v15, t16			
VT7-DD	DPKGDPKGVTVTVT <u>VT</u> TVTVTVT . . GKGDPKPD-NH ₂	3009,4	3008,6	92,3
VT8-DD	DPKGDPKGVTVTVTVT <u>VT</u> TVTVTVTGKGDPKPD-NH ₂	3209,7	3208,3	91,6
iA β 5	LPFFD-COOH	638,7	638,6	97,1

¹ D-Aminosäuren sind unterstrichen; ² mittleres Molekulargewicht

Tabelle 13. Ergebnisse der MALDI-MS-Untersuchungen und HPLC-Gehaltsbestimmungen der D-Aminosäure-substituierten Analoga des VT6

Sequenz ¹	D-Aminosäure-Substitution	[M+H] ⁺ _{best.} ² (Da)	Reinheit (%)
<u>D</u> PKGDPKGVTVTVTVTVTVTVTGKGDPKPD-NH ₂	d1, p2	2808	95,9
DP <u>K</u> GDPKGVTVTVTVTVTVTVTGKGDPKPD-NH ₂	k3	2808	97,1
DPKG <u>D</u> PKGVTVTVTVTVTVTVTVTGKGDPKPD-NH ₂	d5, p6	2810	99,4
DPKGDP <u>K</u> GVTVTVTVTVTVTVTVTGKGDPKPD-NH ₂	k7	2809	98,6
DPKGDPKGV <u>T</u> TVTVTVTVTVTVTVTGKGDPKPD-NH ₂	v9, t10	2807	97,1
DPKGDPKGVTV <u>V</u> TVTVTVTVTVTVTVTGKGDPKPD-NH ₂	v11, t12	2808	97,3
DPKGDPKGVTVTV <u>T</u> TVTVTVTVTVTVTVTGKGDPKPD-NH ₂	v13, t14	2807	97,3
DPKGDPKGVTVTVTV <u>V</u> TVTVTVTVTVTVTVTGKGDPKPD-NH ₂	v15, t16	2809	99,5
DPKGDPKGVTVTVTVTV <u>T</u> TVTVTVTVTVTVTVTGKGDPKPD-NH ₂	v17, t18	2811	99,7
DPKGDPKGVTVTVTVTVTV <u>V</u> TGKGDPKPD-NH ₂	v19, t20	2808	97,7
DPKGDPKGVTVTVTVTVTVTVTG <u>K</u> GDPKPD-NH ₂	k22	2808	98,2
DPKGDPKGVTVTVTVTVTVTVTVTGKGD <u>P</u> KPD-NH ₂	d24	2809	98,9
DPKGDPKGVTVTVTVTVTVTVTVTGKGD <u>P</u> KPD-NH ₂	p25, k26	2810	98,4
DPKGDPKGVTVTVTVTVTVTVTVTGKGD <u>P</u> D-NH ₂	p27, d28	2809	97,9

¹ D-Aminosäuren sind unterstrichen, ² mittleres Molekulargewicht: 2808,2 Da

Tabelle 14. Analytische Daten von Aβ(1-42)¹ und der D-Aminosäure-substituierten Analoga²

Peptid	[M+H] ⁺ bestimmt ^{3,4}	Reinheit (%)	Peptidgehalt (%)
Aβ(1-42)	4513,2	85,5	76,9
D-1/2	4513,7	79,5	75,4
D-3/4	4514,2	81,0	75,2
D-5/6	4513,2	81,1	76,6
D-7/8	4514,8	83,6	76,1
D-10/11	4513,4	72,1	78,1
D-11/12	4513,7	80,0	83,0
D-13/14	4516,1	77,4	71,7
D-15/16	4516,2	81,5	71,4
D-17/18	4513,2	72,2	75,9
D-19/20	4513,2	91,4	74,7
D-21/22	4513,8	83,4	76,3
D-23/24	4514,2	88,6	75,4
D-26/27	4513,8	92,8	72,5
D-27/28	4513,8	91,0	78,7
D-30/31	4514,3	92,5	71,1
D-31/32	4514,2	90,2	75,2
D-34/35	4513,7	94,0	72,6
D-35/36	4513,7	85,0	72,1
D-39/40	4513,2	91,9	74,2
D-41/42	4513,2	95,1	73,4

¹ Sequenz: DAEFRHDSGY¹⁰EVHHQKL²⁰VFF²⁰AEDVGSNKG³⁰IIGLMVGGV⁴⁰IA-COOH, ² Sequenz: Peptidbezeichnung gibt die Position des Doppel-D-Aminosäure-Austausches an, ³ ESI-MS, ⁴ [M+H]⁺_{berechnet}: 4515,1 Da

4.2.5. CD-Spektroskopie

CD-Spektren wurden bei Raumtemperatur an einem J-720 Spektrometer (Jasco, Tokyo, Japan) in 0,1 cm Quarzküvetten aufgezeichnet. Typische Parameter waren ein Wellenlängenbereich von 185-260 nm, eine Akkumulierung von 6 Spektren mit anschließender Mittelwertbildung, Abzug der Nulllinie des Lösungsmittels und Glättung nach Standardprozeduren, 1 nm Bandbreite, 50 mdeg Empfindlichkeit, 50 nm Scangeschwindigkeit, 0,1 nm Auflösung und 0.5 sec als Zeitkonstante.

VT-Peptide. Es wurden Stammlösungen von 1×10^{-4} M in Wasser hergestellt. Für die CD-Untersuchungen wurden diese Proben 1:1 (v/v) mit Wasser, 30 mM SDS oder mit TFE verdünnt, um eine resultierende Meßkonzentration von 5×10^{-5} M in Wasser, 15 mM SDS oder in 50% TFE zu erhalten. Für die Untersuchung der pH-Abhängigkeit wurden die Stammlösungen 1:1 mit 150 mM Natriumphosphatpuffer (pH 2,4; 4,4 oder 7,4) verdünnt.

Für die Guanidinhydrochlorid-Denaturierungsexperimente wurden von den Peptiden VT6, VT7, und VT8 Stammlösungen von 5×10^{-4} M sowie eine 8 M Guanidinhydrochloridlösung jeweils in 75 mM Natriumphosphatpuffer (pH 4,4) hergestellt. 30 μ l der Peptidstammlösungen wurden mit 270 μ l verschiedenerer Mischungen aus 8M Guanidinhydrochlorid und Puffer verdünnt. Es resultierten Meßlösungen mit einer Peptidkonzentration von 5×10^{-5} M und einem abgestuften Guanidinhydrochlorid-Gehalt von 0-7,2 M in 75 mM Natriumphosphatpuffer (pH 4,4).

Für die Temperatur-Denaturierungsexperimente der Peptide VT6, VT7 und VT8 wurden Peptidlösungen von 5×10^{-5} M in Wasser vermessen. Die Temperatur wurde in 10°C-Schritten von 25°C auf 85°C erhöht.

A β -Peptide. Es wurden Stammlösungen von 2×10^{-4} M in TFE hergestellt. Diese Proben wurden 1: 10 (v/v) mit unterschiedlichen Mischungen aus TFE und Wasser verdünnt, so daß eine resultierende Meßkonzentration von 2×10^{-5} M in 50%, 60%, 70%, und 80% TFE vorlag. Zur Berechnung des Helixanteils (h) von A β (1-42) wurde die Gleichung nach Chen *et al.* (1972) genutzt:

$$h(\%) = \frac{[\Theta] - [\Theta]^{0\%}}{[\Theta]^{100\%}}, \quad (6)$$

worin $[\Theta]$ die gemessene mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest bei 222 nm und $[\Theta]^{0\%}$ bzw. $[\Theta]^{100\%}$ die Elliptizitäten von 0% und 100% Helizität bei 222 nm bedeuten.

4.2.6. FTIR-Spektroskopie

Die FTIR-Spektren wurden bei Raumtemperatur mit einem ISF-66 FTIR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, Deutschland), ausgestattet mit einem DTGS Detektor, aufgenommen. Das Spektrometer wurde kontinuierlich mit getrockneter Luft gespült, um störende Beiträge von atmosphärischem Wasserdampf zu minimieren. Die nach 4.2.1.-4.2.3. synthetisierten und gereinigten Peptide enthielten bedingt durch den Zusatz von TFA bei der Harzabspaltung und der chromatographischen Aufreinigung Trifluoracetat als Gegenion. Im Infrarotspektrum manifestiert sich dieses Ion durch eine Absorptionsbande bei $\sim 1673 \text{ cm}^{-1}$ (Haris & Chapman, 1995) und überlappt daher im Amid-I-Bereich mit interessierenden konformationssensitiven Banden der Peptide. Zur Substitution des Trifluoracetats durch Chlorid wurde deshalb zweimal mit 10 mM Salzsäure lyophilisiert. Es wurden frisch angesetzte Lösungen der VT-Peptide mit Konzentrationen von 0,5 und $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ in 30 mM Natriumphosphatpuffer/ D_2O (pH 2,2) und der A β -Peptide von $4,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ in 80% TFE-*d*1/20% D_2O (v/v) untersucht. Die Proben wurden in CaF_2 -Küvetten mit einer Schichtdicke von 50 μm vermessen. Zur Erzeugung von Spektren mit einer nominalen Auflösung von 4 cm^{-1} wurden jeweils 128 Interferogramme addiert und Fourier-transformiert. Lösungsmittelspektren wurden unter identischen Bedingungen aufgenommen und vom Peptidspektrum abgezogen. Minimale störende Restbeiträge von Wasserdampfbanden in den Peptidspektren wurden mittels zuvor aufgenommener Wasserdampfspektren rechnerisch korrigiert (Fabian *et al.*, 1993b). Zur besseren Visualisierung von sich partiell überlappenden Banden wurden die Spektren einer Fourier Selbstentfaltung (self-deconvolution) unterzogen.

4.2.7. NMR-Spektroskopie

Alle NMR Spektren wurden an einem DMX 600 Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) bei 300K aufgenommen. A β (1-42) wurde in 80% TFE/20% Wasser (v/v) mit einer Konzentration von 2 mM bei pH 2.5 gelöst. Typische Aufnahmeparameter waren eine Spektralbreite von 8333 Hz und eine 90° -Pulslänge von 10.1 μs . Aminosäure-spezifische Spinsysteme wurden mittels DQF (*double quantum filtered*) -COSY (Piantini *et al.*, 1982) und TOCSY (Braunschweiler & Ernst, 1983; Davies & Bax, 1985) Spektren ermittelt. Die Zuordnungen zur sequentiellen Verknüpfung der Aminosäuren erfolgte mit Hilfe von NOESY Spektren (Jeener *et al.*, 1979). Zweidimensionale Spektren wurden mit 4k komplexen Datenpunkten, 32 Transienten und 512 komplexen Inkrementen aufgenommen.

Folgende Mischzeiten wurden verwendet: NOESY 100-200 ms, TOCSY 60-85 ms. Die Daten wurden unter Linux mit den Programmen NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995) prozessiert und NMRView (Johnson & Blevins, 1994) analysiert.

4.2.8. Strukturberechnungen

Die zur Strukturberechnung eingesetzten Abstandsinformationen wurden aus Peakintensitäten des NOESY Spektrums ermittelt und entsprechend ihrer Intensität in drei Klassen eingeteilt: schwach 1,5-5,0 Å, mittel 1,5-3,5 Å und stark 1,5-3,0 Å, wobei über-

Tabelle 15. Statistik für 15 ausgewählte Konformationen von A β (1-42) nach Energieminimierung

Restraints für Strukturberechnungen	
Total	287
Totale Anzahl von NOE Restraints	264
Innerhalb von AS ¹	107
Sequentiell zwischen AS	80
Abstand Restraints >1 i-j	77
J-coupling restraints	23
Statistik	
RMSD von idealisierter Geometrie	<SA>
Bindungen (Å)	0.0019 ± 0.0001
Bindungswinkel (°)	0.489 ± 0.007
Torsionswinkel (°)	0.415 ± 0.011
NOEs	0.028 ± 0.001
J-Kopplung Constraints	0.010 ± 0.001
-1	
ETotal	66.88 ± 1.97
EBindungen	2.20 ± 0.19
EBindungswinkel	40.87 ± 1.28
ETorsionswinkel	8.56 ± 0.44
EvdW	3.79 ± 0.46
ENOE	10.70 ± 0.70
EJ-Kopplung	0.70 ± 0.20
Präzision (Å)	<SA> vs. <SA _{av} >
RMSD der Rückgratatome (N, C α , C')	
AS 28-36	0.57 ± 0.17
RMSD aller Schweratome	1.19 ± 0.21
AS 28-36	0.95 ± 0.17
PROCHECK Ramachandran-Plot Statistik	
AS in am meisten favorisierten Regionen	60.8
AS in zusätzlich erlaubten Regionen	32.0
AS in allgemein erlaubten Regionen	4.0
AS in unerlaubten Regionen	3.1

¹ Aminosäuren

lappenden Peaks ein Abstandsbereich von 1,5-5,0 Å zugewiesen wurde. Alle nicht-stereospezifisch bestimmten Methyl-, Methylen- und aromatischen Ringprotonen wurden Pseudoatom-korrigiert. Distanzgeometrie und Moleküldynamik Berechnungen wurden mit XPLOR 3.1 (Brünger, 1993) unter Anwendung von Standardprotokollen (*hybrid distance geometry-simulated annealing approach*, DGSA) realisiert. Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der SA-Berechnungen.

4.2.9. HPLC-Untersuchungen

Das Retentionsverhalten des VT6-DD-Substitutionssets an einer hydrophoben stationären Phase wurde unter Verwendung einer Polyencap Säule A300, 8 µm, 250 x 4 mm, i.d. an einem Shimadzu Class-LC10 HPLC-System (siehe 4.2.3.) bei 25°C mit einer 20 µl-Probenschleife und einer Flußrate von 1ml/min mit Gradiententrennung (5-75% Eluent B in 40 min; Eluent A: 0,1% TFA in Wasser, Eluent B: 0,1% TFA in 80% ACN/20% Wasser) untersucht. Die Peptide (1mg/ml) wurden 10 min vor der Injektion in 5% ACN/95%-0,1% TFA Wasser gelöst.

4.2.10. Größenausschlußchromatographie

SEC-Experimente zur Untersuchung des Assoziationsverhalten der VT-Peptide wurden mit einer Spheroegel-Säule TSK-2000 (300 x 7,5 mm i.d., Pharmazia LKB, Schweden) durchgeführt. Der Trennbereich der Säule ist in Abhängigkeit von der Teilchenform für globuläre Proteine mit 5-100 kDa, für Polyethylenglykole (linear) mit 0,5-15 kDa und für Dextrane (verzweigt) mit 1-30 kDa angegeben. Es wurde an einer Shimadzu Class-LC 10 HPLC-Anlage (siehe 4.2.3.) mit einer 20 µl-Probenschleife bei Raumtemperatur und UV-Detektion bei 222 nm chromatographiert. Als Elutionsmittel wurde 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 4,4) mit einer Flußrate von 1 ml/min verwendet. Die Peptidlösungen von 1×10^{-3} M und 1×10^{-4} M in Wasser wurden 30 min nach ihrem Auflösen vermessen. Zur Kalibrierung der Säule wurden die Peptide Substanz P und *corticotropin-releasing hormone* mit einer Konzentration von 1mg/ml in Wasser eingesetzt.

4.2.11. Analytische Ultrazentrifugation

Die (VT)_n- und (VT)_n-DD-Peptide wurden bei einer Konzentration von 1 mg/ml in 30 mM Natriumphosphatpuffer, pH 4,4/0,9% Natriumchlorid gelöst und bei 20°C in Standard Doppel-Sektorzellen in einer Analytischen Ultrazentrifuge XL-A (Beckman, Palo Alto, CA) zentrifugiert. Die Wanderung der sedimentierenden Grenzschicht zum Zellboden wurde zeitabhängig bei 225 nm verfolgt und mit dem Computerprogramm LAMM (Behlke & Ristau, 1997) ausgewertet, um die Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten zu erhalten. Ausgehend von diesen Parametern, dem partiellen spezifischen Volumen, das aus der Aminosäure-Zusammensetzung und den entsprechenden Dichte-Inkrementen (Cohn & Edstall, 1943) berechnet wurde, erfolgte unter Zugrundelegung der Svedberg-Gleichung die Kalkulation des Molekulargewichtes der monomeren und assoziierten Peptide.

4.2.11. Dynamische Lichtstreuung

VT-Peptide. Die DLS-Untersuchungen wurden an einem Spektrometer, ausgestattet mit einem Argonlaser (488 nm, 2W, Spectra Physics 2017), einem ALV/SP-86 Spektrogoniometer (ALV, Langen, Deutschland) und einem ALV-FAST/5000/E Digital-Korrelator bei 20,0±0,1°C und einem Streuwinkel von 30° durchgeführt. Die Peptide (2 x 10⁻⁴ M in 30mM Natriumphosphatpuffer, pH 4,4) wurden sofort nach dem Lösen filtriert (Ministart Sterilfilter, 200 nm Porengröße) und innerhalb von einer 1 Minute in das Spektrometer eingebracht, um die Datenaufnahme zu beginnen.

Aβ-Peptide. Für die DLS-Untersuchungen der Aβ-Peptide wurde ein Spektrometer, ausgestattet mit einem Argonlaser (514,5 nm, 0,5 W, Lexel 3500, Lexel Inc., California), einem speziellen Photonen-Detektionssystem für µl-Küvetten (Streuwinkel 90°) und einem Eigenbau-Korrelator (Multi-Bit, Multiple Tau) genutzt. Die Peptide (1mg/ml in 80% TFE/20% Wasser, v/v) wurden nach dem Lösen in 50 µl Durchflußzellen filtriert (Anodisc-Filter, 100 nm, Whatman, UK), welche sowohl in das DLS-Spektrometer als auch in ein Beckman DU-650 Spektralphotometer paßten. Die Peptidkonzentration wurde vor und nach der Filtration spektralphotometrisch unter Verwendung einer kalkulierten Absorption $A(276 \text{ nm}, 1 \text{ cm}, 1 \text{ mg/ml}) = 0,32$ bestimmt (Gill & von Hippel, 1989). Die DLS-Messungen erfolgten bei 20°C. Als Referenzsubstanz für die Streuintensität wurde Benzen verwendet. Die Verteilungsfunktionen der Translationsdiffusionskoeffizienten D und die entsprechenden Größenverteilungen der Stokes-Radien wurden aus der gemessenen Autokorrelations-

funktion mit Hilfe des Programms CONTIN (Provencher, 1982) ermittelt. Die Verteilungsfunktionen wurden in der Weise normalisiert, daß sich die Peakflächen der Monomere und Assoziante (a_M) und (a_A) proportional zu den Gesamtstreuintensitäten verhalten. Die Abschätzung des Anteils an Assoziaten im Filtrat von A β (1-42) und des Analogon D-21/22 wurde auf der Basis des Peakflächenverhältnisses a_A/a_M (2,5 sowie 75) durchgeführt. Da hierfür die Kenntnis der Form der Assoziante erforderlich ist, diese jedoch mittels des experimentellen Ansatzes nicht eindeutig bestimmt werden konnte, wurden eine Reihe von Annahmen getroffen. Da sich die Peakflächen proportional zur Streuintensität der Monomere und Assoziante verhalten, gilt $a_M = \text{const.} \cdot c_M \cdot M_M \cdot P_M$ and $a_A = \text{const.} \cdot c_A \cdot M_A \cdot P_A$. M und M_A sind die molaren Massen der Monomeren und Assoziante, const. ist ein experimenteller Parameter und P ist die Streufunktion der Partikel, welche von der Wellenlänge, dem Streuwinkel und der Partikelgeometrie abhängt. Für kleine Partikel wie Peptidmonomere ist $P=1$. Um das Konzentrationsverhältnis c_A/c_M berechnen zu können, ist die Kenntnis M_A/M erforderlich. Letzteres kann aus dem Verhältnis der Stokes-Radien $(R_{S,A}/R_S)^n$ abgeschätzt werden, wobei n von der Geometrie der Partikel abhängt. Für A β (1-42) wurde $n=2$ angenommen, was einer Morphologie entspricht, die sich zwischen einer linearen ($n=1$) und einer kubischen Form ($n=3$) einordnet. Damit konnte ein Verhältnis c_A/c_M von $\approx 0,1$ berechnet werden, was einen monomeren Zustand des Peptides beschreibt. Für die Berechnung von c_A/c_M für D-21/22 wurde die mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesene fibrilläre Morphologie der Assoziante zu Grunde gelegt. Unter Verwendung eines Zylinder-Modells (De La Torre & Bloomfield, 1981), eines Fibrillendurchmesser von 8 nm und einer Fibrillenlänge von 160 nm, welche aus $R_{S,A}=24$ nm berechnet wurde, sowie eines Massen/Längen-Verhältnisses von 7 kDa/nm (Lomakin *et al.*, 1996) wurde $c_A/c_M = 0,43$ kalkuliert, was einem Assoziatanteil von 30% entspricht.

4.2.12. Kongo Rot Anfärbung

Es wurden Peptidlösungen von 1 mg/ml in Wasser hergestellt. 10 μ l dieser Lösungen wurden auf einen Objektträger gegeben, bei 50°C 10 min lang getrocknet und mit einer gesättigten Lösung von CR in 80% Ethanol/20% Wasser (v/v) 20 min bedeckt. Anschließend wurde die Präparation nacheinander mit Wasser, 80% Ethanol/20% Wasser (v/v), absolutem Ethanol und Wasser gewaschen und mit einem Lichtmikroskop im Hellfeld und zwischen gekreuzten Polarisatoren betrachtet (Vergrößerung: 400x).

4.2.13. Thioflavin T Assay

Die Peptide A β (1-42) und D-21/22 wurden in 80% TFE/20% Wasser (v/v) mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. In eine mit Magnetrührer bestückte quadratische 1 cm Polystyren-Küvette wurden 1,96 ml 3 μ M ThT in 50mM Glycin (pH 9,1) pipettiert. Die Küvette wurde in einem Probenhalter mit Rührwerk eines LS 50 B Fluoreszenz-Spektrofluorimeters (Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland) eingesetzt und bei 25°C temperiert. Unter gleichmäßigem Rühren wurden 40 μ l der Peptidlösung zugesetzt und sofort der Verlauf der Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{em}=482$ nm unter Anregung bei $\lambda_{exc}=450$ nm aufgezeichnet. Nach dem Erreichen eines Plateaus wurde der Wert bei 240 Sekunden vom Untergrundsignal der ThT-Lösung abgezogen. Alle Experimente wurden zweifach durchgeführt.

Zur Bestimmung des inhibitorischen Effektes von iA β 5 auf die Fibrillenbildung von D-21/22 wurden 1 mg/ml des Peptides in 80% TFE/20% Wasser (v/v) mit und ohne einem 10-fachen molaren Überschuß von iA β 5 (1,4 mg/ml) sieben Tage bei 37°C inkubiert. Die ThT-Untersuchungen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Das Fluoreszenz-Signal des iA β 5 (1,4 mg/ml in 80% TFE/20% Wasser, v/v) wurde subtrahiert.

4.2.14. Elektronenmikroskopie

VT-Peptide. Es wurden Peptidlösungen mit einer Konzentration von 2×10^{-4} M in Wasser hergestellt und 24 Stunden bis zur Probenpräparation bei Raumtemperatur gelagert. Als Objektträger wurden Formvar-Kupfernetze (200 Maschen) mit einem Kohlefilm (Plano, Wetzlar, Deutschland) verwendet.

A β -Peptide. Das Analogon D-21/22 wurde in 80% TFE/20% Wasser bei einer Peptidkonzentration von 1 mg/ml gelöst. Zur Probenpräparation wurden Kupfernetze (300 Maschen) mit einem Kohlefilm (Plano, Wetzlar, Deutschland) genutzt.

5 μ l-Aliquote der Peptidlösungen wurden auf den Kupfernetzen für 60 Sekunden adsorbiert. Zur Entfernung der überstehenden Lösung wurde mit Filterpapier seitlich abgesaugt und luftgetrocknet. Zur Negativkontrastierung wurden 5 μ l frisch angesetzte, 2%ige Uranylacetat-Lösung (w/v) zugegeben und nach 60 Sekunden mit Filterpapier abgesaugt. Die getrockneten Proben wurden mit einem 902 A Elektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 80 kV untersucht.