



# Makrocyclische Peptide mit dem Zielprotein angepassten Kohlenwasserstoffbrücken: Inhibitoren einer pathogenen Protein-Protein-Wechselwirkung\*\*

Adrian Glas, David Bier, Gernot Hahne, Christoph Rademacher, Christian Ottmann\* und Tom N. Grossmann\*

**Abstract:** Bioaktive Peptidkonformationen können durch Makrocyclisierung stabilisiert werden, was zu einer Erhöhung der biologischen Aktivität führen kann. Solche makrocyclischen Peptide wurden bereits für die Modulation einer Reihe von biologischen Funktionen, im Besonderen als Inhibitoren von Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) verwendet. Allerdings handelt es sich bei den meisten Peptid-abgeleiteten PPI-Inhibitoren um stabilisierte  $\alpha$ -Helices, wodurch eine Vielzahl von Sekundärstrukturen nicht berücksichtigt wird. Hier präsentieren wir einen rationalen Ansatz zur Stabilisierung von Peptiden mit irregulärer Struktur durch die Einführung einer hydrophoben Kohlenwasserstoffbrücke. Diese Brücke ersetzt dabei Aminosäureseitenketten, welche für die Bindung an das Zielprotein essentiell sind. Die Wechselwirkung wurde im molekularen Detail durch Röntgenstrukturanalyse und isotherme Titrationskalorimetrie untersucht. Als Ergebnis entstanden intramolekular verbrückte Peptide, die die Interaktion zwischen dem humanen Adapterprotein 14-3-3 und dem Virulenzfaktor Exoenzym S inhibieren. Da irreguläre Peptidstrukturen vielfach in PPIs vorkommen, bietet unser Ansatz Zugang zu neuen Peptid-basierten Inhibitoren.

Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) spielen in allen Aspekten der Zellorganisation und -funktion eine entscheidende Rolle. Die Inhibition solcher PPIs erlaubt es, biologische Prozesse zu beeinflussen und wird daher als vielversprechender Ansatz zur Generierung neuartiger Therapeutika angesehen. PPIs beinhalten häufig große Interaktionsflächen, denen es oft an gut definierten Bindungstaschen mangelt. Dies erschwert den Einsatz von klassischen, niedermolekularen Inhibitoren.<sup>[1]</sup> Eine vielversprechende Alternative stellen peptidbasierte Inhibitoren dar.<sup>[2]</sup> Kurze Peptidsequenzen

liegen in Lösung meist hoch flexibel vor und nehmen erst bei der Bindung eine definierte dreidimensionale Struktur ein. Die Vororganisierung<sup>[3]</sup> solcher Peptide in ihre bioaktive Konformation kann daher die Bindungsaffinität und damit die biologische Aktivität erhöhen.<sup>[1a]</sup> Eine Strategie zur Einführung solcher konformationeller Einschränkungen stellt die Makrocyclisierung dar.<sup>[1a,4]</sup> So wurden lineare Peptide intramolekular verbrückt, um klassische cyclische und bicyclische Peptide mit erhöhter Bioaktivität zu erhalten.<sup>[5]</sup> Darüber hinaus wurden  $\beta$ -Faltblätter<sup>[6]</sup> und  $\alpha$ -Helices<sup>[4]</sup> über Makrocyclisierungstechniken stabilisiert. Bei peptidabgeleiteten PPI-Inhibitoren wurden vor allem  $\alpha$ -helicale Konformationen stabilisiert. Besonders erfolgreich wurden dabei Wasserstoffbrückensurrogate (HBS; hydrogen-bond surrogates)<sup>[7]</sup> und kohlenwasserstoffverbrückte,  $\alpha$ -methylierte Aminosäuren (stapled peptides)<sup>[8]</sup> verwendet.

Das rationale Design von peptidbasierten PPI-Inhibitoren unterliegt zwei wichtigen Limitierungen: Erstens sind die eingeführten Verbrückungen nicht konzipiert, um eine Bindung mit dem entsprechenden Interaktionspartner einzugehen (einige Beispiele weisen jedoch darauf hin, dass direkte positive Beiträge zur Bindung möglich sind).<sup>[9]</sup> Zweitens basieren die meisten peptidabgeleiteten PPI-Inhibitoren auf  $\alpha$ -Helices,<sup>[4]</sup> was die Auswahl an Interaktionsmotiven deutlich einschränkt.<sup>[10]</sup> Daher gibt es derzeitig keinen rationalen Ansatz für die Stabilisierung von irregulären Peptidstrukturen, welche jedoch häufig in PPIs beobachtet werden.<sup>[10]</sup> Hier zeigen wir die strukturbasierte Entwicklung makrocyclischer Peptide, welche bei der Bindung an das Zielprotein eine irreguläre Sekundärstruktur einnehmen. Die Makrocyclisierung erfolgt durch eine Kohlenwasserstoffbrücke, die explizit für die Interaktion mit dem Zielprotein entworfen wurde.

[\*] A. Glas,<sup>[+]</sup> D. Bier,<sup>[+]</sup> Dr. G. Hahne, Dr. T. N. Grossmann  
Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft  
Otto-Hahn-Straße 15, 44227 Dortmund (Deutschland)  
E-Mail: c.ottmann@tue.nl  
tom.grossmann@cgc.mpg.de

Dr. C. Rademacher  
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung  
Am Mühlenberg 1, 14424 Potsdam (Deutschland)  
Dr. C. Ottmann  
University of Eindhoven, Department of Biomedical Engineering  
Den Dolech 2, 5612 AZ Eindhoven (Niederlande)

Dr. T. N. Grossmann  
Technische Universität Dortmund  
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie  
Otto-Hahn-Str. 6, 44227 Dortmund (Deutschland)

[+] Beide Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

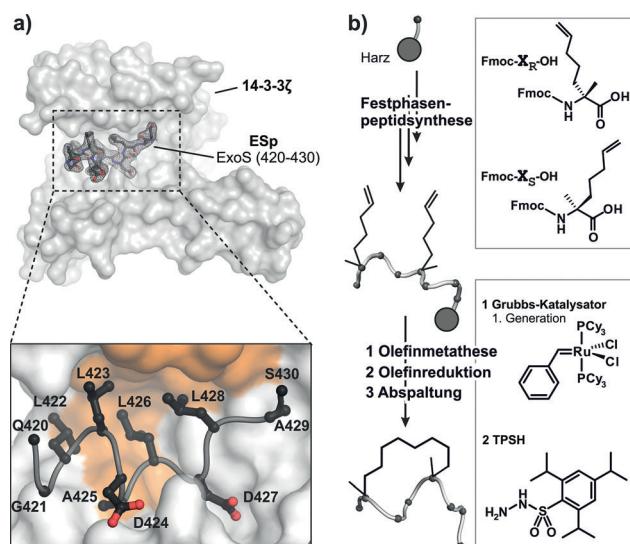
[\*\*] Wir danken C. Martin (Technische Universität Dortmund) für die Durchführung der hochauflösten Massenspektrometrie sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, Emmy-Noether-Programm RA1944/2-1 und GR3592/2-1), AstraZeneca, Bayer CropScience, Bayer HealthCare, Boehringer Ingelheim, Merck KGaA und der Max-Planck-Gesellschaft für Unterstützung. T.N.G. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201310082> zu finden.

Diese Peptide inhibieren die pathogene Wechselwirkung zwischen dem Virulenzfaktor Exoenzym S (ExoS) und dem humanen Protein 14-3-3. Anhand von Kristallstrukturen und isothermer Titrationskalorimetrie (ITC; isothermal titration calorimetry) zeigen wir im Detail, wie die hydrophobe Brücke zur Bindung beiträgt.

Unser Ziel war die Entwicklung von makrocyclischen Peptiden, die die Wechselwirkung zwischen ExoS und 14-3-3 inhibieren. ExoS ist ein Virulenzfaktor des pathogenen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*, einem weitverbreiteten opportunistischen Pathogen, das häufig an Krankenhausinfektionen beteiligt ist.<sup>[11]</sup> Kein bekanntes Antibiotikum ist in der Lage, eine etablierte und chronische Infektion mit multiresistenten Stämmen dieses Bakteriums zu kurieren.<sup>[12]</sup> Die Inhibition der ExoS-(14-3-3)-Wechselwirkung wird dabei als vielversprechendes therapeutisches Ziel angesehen.<sup>[13]</sup> Diese PPI wird über einen Peptidabschnitt von ExoS vermittelt, welcher 14-3-3 in einer irregulären Konformation bindet.<sup>[13]</sup> Vorherige Studien haben gezeigt, dass hauptsächlich 11 Aminosäuren (<sup>420</sup>QGLLDALDLAS<sup>430</sup>, ESp) zur Bindung beitragen.<sup>[13,14]</sup> Daher entschieden wir uns, diese ESp-Sequenz als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines makrocyclischen PPI-Inhibitors zu verwenden. Um den genauen Bindungsmodus von ESp zu ermitteln, wurde eine N-terminal acetylierte Version des Peptids in Komplex mit 14-3-3 $\zeta$  (aa 1–230) cokristallisiert. Die erhaltenen Kristalle streuten bis zu einer Auflösung von 2.3 Å (PDB: 4N7G) und erlaubten die Abbildung aller 11 Aminosäuren (Abbildung 1a), welche nahezu perfekt (rmsd = 0.171 Å) mit der bereits bekannten ExoS-Struktur überlagern (Abbildung S8 und S11).<sup>[13]</sup> ESp bindet 14-3-3 $\zeta$  in einer irregulären und gestreckten Struktur, wobei mit Ausnahme des N-terminalen Asparagins (Q420) alle Aminosäuren zur Bindung an 14-3-3 $\zeta$  beitragen. Dabei werden entscheidende hydrophobe Kontakte zwischen einem unpolaren Bereich auf 14-3-3 $\zeta$  (orange, Abbildung 1a) und der Kernregion von ExoS gebildet, welche vier Leucine (L422, L423, L426, L428) und ein Alanin (A425) beinhaltet.

Die ausgestreckte Struktur des gebundenen ESp schließt eine Cyclisierung der N- und C-Termini, wie es von klassischen cyclischen Peptiden bekannt ist, aus. Daher untersuchten wir die Sequenz auf potentielle Seitenketten, welche die Einführung einer Verbrückung zulassen würden. Wir stellten dabei fest, dass sich drei Paare von hydrophoben Aminosäuren (L422/L426, L422/A425, L423/L426) für die Cyclisierung eignen könnten, auch wenn alle diese Reste direkt an der Bindung von 14-3-3 beteiligt sind (Abbildung S12). Um den hydrophoben Charakter dieser Aminosäuren beizubehalten, entschieden wir uns für die Verwendung der Ringschlussmetathese (RCM; ring-closing metathesis) in Analogie zur Cyclisierung von  $\alpha$ -methylierten Aminosäuren beim Peptide-Stapling zur Stabilisierung von  $\alpha$ -Helices.<sup>[8]</sup> Dieser Ansatz beinhaltet Fmoc-basierte Festphasenpeptidsynthese mit oleinhaltigen Baustein zur Einführung von  $\alpha$ -methylierten,  $\alpha$ -alkenylierten nichtnatürlichen Aminosäuren (Abbildung 1b).<sup>[8]</sup> Die RCM wurde an der festen Phase unter Verwendung des Grubbs-Katalysators der ersten Generation durchgeführt. Um ein Gemisch von Diastereomeren mit *E*- und *Z*-konfigurierten Doppelbindungen zu vermeiden, entscheiden wir uns, diese mit 2,4,6-Tri-

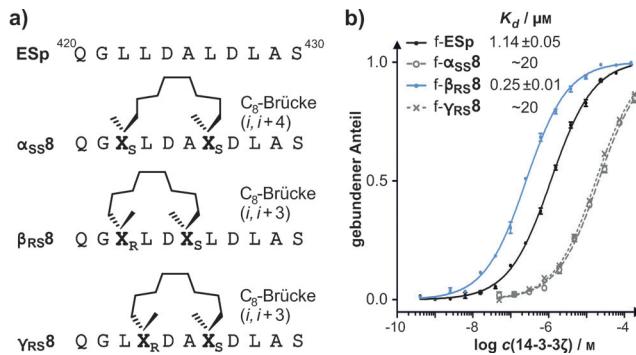


**Abbildung 1.** a) Oben: Kristallstruktur von 14-3-3 $\zeta$  im Komplex mit ESp (Bindungen: schwarz C, rot O, blau N) mit der finalen (2F<sub>o</sub>–F<sub>c</sub>)-Elektronendichte (konturiert bei 1 $\sigma$ ). Unten: Im Detail die interagierenden Seitenketten von ESp. Der hydrophobe Bereich von 14-3-3 $\zeta$  ist orange markiert (F117, P165, I166, G169, L172, L216, I217, L220). b) Syntheseroute zur Makrocyclisierung von Peptiden. Olefin-modifizierte Aminosäuren werden während der Festphasenpeptidsynthese eingeführt und anschließend über 1) Ruthenium-katalysierte RCM verbrückt, 2) das Olefin mit TPSH reduziert und 3) mit Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten (Fmoc: Fluorenylmethyloxycarbonyl; TPSH: 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäurehydrazid).

isopropylbenzolsulfonylhydrazid (TPSH) zu reduzieren. Je nach späterer Verwendung wurden die N-terminalen Amine entweder acetyliert oder nach Polyethylenglycol(Peg)-Kupplung mit Fluorescein modifiziert. Die fluoreszierenden Peptide werden im Folgenden mit dem Präfix „f“ versehen.

Anfangs wurden drei Peptide mit jeweils zwei  $\alpha$ -methylierten nichtnatürlichen Aminosäuren hergestellt, welche intramolekular über eine (CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-Kohlenwasserstoffbrücke verknüpft wurden. Eines der Peptide ( $\alpha_{SS}8$ ) enthält zwei *S*-konfigurierte nichtnatürliche Aminosäuren (X<sub>S</sub>) an Position *i* und *i* + 4. Die anderen beiden Peptide ( $\beta$ - und  $\gamma_{RS}8$ ) wurden jeweils mit einem *R*- und einem *S*-konfigurierten Baustein in Position *i* und *i* + 3 modifiziert (Abbildung 2a). Die Peptide wurden auf ihre Bindungsaffinität zu 14-3-3 $\zeta$  mittels Fluoreszenzpolarisation (FP) untersucht. Anhand der FP-Bindungskurven wurden die Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) bestimmt (Abbildung S3). Dies ergab für die Interaktion zwischen 14-3-3 $\zeta$  und f-ESp einen  $K_d$ -Wert von 1.14  $\mu\text{M}$  (Abbildung 2b). Die verbrückten Peptide f- $\alpha_{SS}8$  und f- $\gamma_{RS}8$  wiesen eine ungefähr 20fach schwächere Bindung zu 14-3-3 $\zeta$  auf ( $K_d \approx 20 \mu\text{M}$ ). Für f- $\beta_{RS}8$  wurde eine 4.6fach verstärkte Bindung ( $K_d = 0.25 \mu\text{M}$ ) verglichen mit f-ESp beobachtet. Dies ist besonders beachtlich, da durch die Verbrückung Leucin L422 ersetzt wurde, das als essentiell für die Bindung an 14-3-3 eingestuft wurde.<sup>[13]</sup>

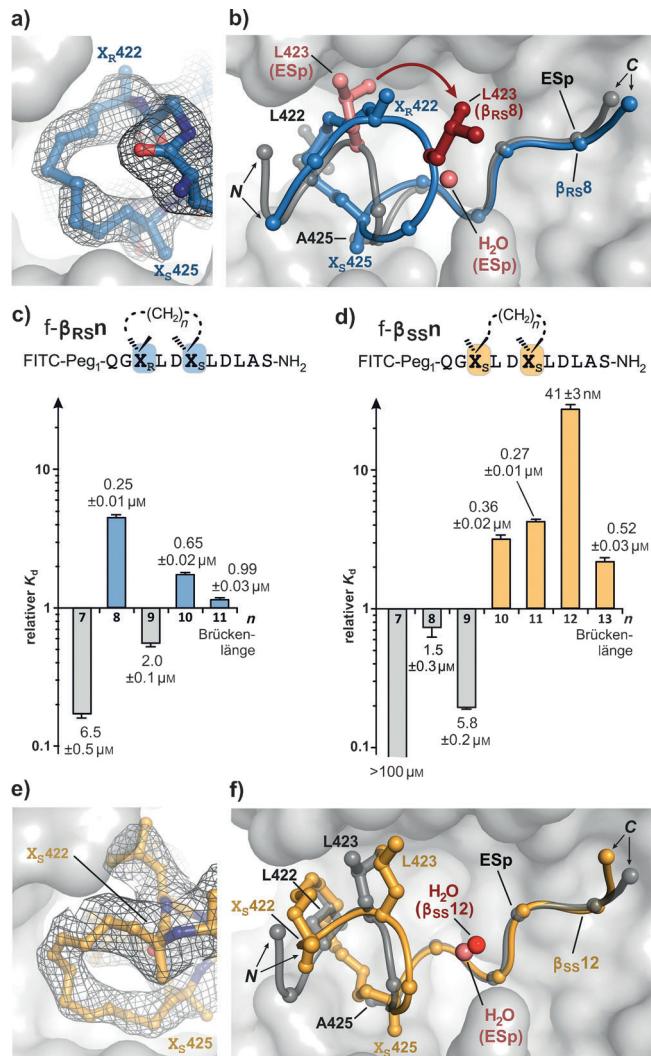
Um die molekulare Grundlage der  $\beta_{RS}8$ -(14-3-3)-Interaktion zu verstehen und so eine Optimierung der Kohlenwasserstoffbrücke zu ermöglichen, wurde  $\beta_{RS}8$  mit 14-3-3 $\zeta$  (aa 1–230) cokristallisiert. Die erhaltenen Kristalle streuten bis



**Abbildung 2.** a) Modifizierte Peptide mit drei verschiedenen Verbrückungsarchitekturen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) jede mit einer C<sub>8</sub>-Brücke. Die absolute Konfiguration der  $\alpha$ -methylierten, nichtnatürlichen Aminosäuren wird durch den tiefgestellten Buchstaben angezeigt ( $X_R$ : R-konfiguriert,  $X_S$ : S-konfiguriert). b) FP-Experiment von Fluorescein-markierten Peptiden in Wechselwirkung mit 14-3-3 $\zeta$  (Dreifachmessung, Fehler für 1 $\sigma$ ).

2.1 Å (PDB: 4N7Y). Die Elektronendichte für  $\beta_{RS8}$  erlaubte die Zuordnung des gesamten Peptids, einschließlich der hydrophoben Kohlenwasserstoffbrücke, welche mit unpolaren Resten von 14-3-3 $\zeta$  interagiert (Abbildung 3a sowie Abbildungen S13 und S14). Vergleicht man  $\beta_{RS8}$  und ESp im Komplex mit 14-3-3 $\zeta$ , zeigt sich, dass beide die gleiche Bindetasche besetzen (Abbildung 3b). Bemerkenswert ist aber, dass der N-terminale Teil des Peptidrückgrats von  $\beta_{RS8}$  im Vergleich zu ESp umgelagert ist, was zu einem Verlust von direkten sowie Wasser-vermittelten polaren Kontakt führt. Am auffälligsten ist dabei die Abwesenheit eines Wassermoleküls in der Struktur von  $\beta_{RS8}$  mit 14-3-3 (rot, Abbildung 3b). Dieses Wassermolekül bildet im ESp-(14-3-3)-Komplex Wasserstoffbrücken mit dem Rückgrat von ESp (Abbildung S16). Zusätzlich wurde die Umlagerung des wichtigen Leucins L423 (rot, Abbildung 3b) in  $\beta_{RS8}$  beobachtet, was zu einem Verlust der Wechselwirkung zwischen L423 und 14-3-3 $\zeta$  führt. Um die Bindung des Peptids weiter zu verbessern, wurde die Kohlenwasserstoffbrücke hinsichtlich ihrer Länge und der Konfiguration der nichtnatürlichen Aminosäuren optimiert. Zur Erstellung einer kleinen Peptidbibliothek wurde  $\beta_{RS8}$  (Brückenlänge  $n=8$ ) als Startpunkt gewählt. Zuerst wurden Peptide mit der gleichen Konfiguration (R in Position 422 und S in Position 425), aber mit verschiedenen Brückenlängen synthetisiert ( $n=7-11$ ). Die Peptide wurden Fluorescein-markiert und bezüglich ihrer Affinität zu 14-3-3 $\zeta$  mittels FP getestet (Abbildung 3c). Der Einbau einer verkürzten Brücke ( $n=7$ ;  $K_d=6.5 \mu\text{M}$ ) führte zu einem drastischen Affinitätsverlust im Vergleich zu  $\beta_{RS8}$  ( $K_d=0.25 \mu\text{M}$ ). Interessanterweise führten auch längere Verbrückungen ( $n=9-11$ ) nicht zu einer erhöhten Affinität ( $K_d=0.65-2.0 \mu\text{M}$ ), womit sich  $\beta_{RS8}$  als affinster Binder in dieser Serie herausstellte.

Als nächstes entschieden wir uns, die Konfiguration der beiden nichtnatürlichen Aminosäuren zu variieren. Bei genauerer Betrachtung der Struktur des  $\beta_{RS8}$ -(14-3-3 $\zeta$ )-Komplexes (Abbildung 3a) wird deutlich, dass X<sub>S425</sub> entscheidend an der Bindung zu 14-3-3 $\zeta$  beteiligt ist und diese Position daher für eine Änderung der Konfiguration ungeeignet ist.



**Abbildung 3.** a) Finale (2F<sub>0</sub>–F<sub>c</sub>)-Elektronendichte (konturiert bei 1 $\sigma$ ) um die Verbrückung von  $\beta_{RS8}$ . b) Seitenansicht der überlagerten Strukturen von ESp (semitransparent grau) und  $\beta_{RS8}$  (blau) in Bänderdarstellung im Komplex mit 14-3-3 $\zeta$  (graue Oberfläche). Die Kohlenwasserstoffverbrückung und ausgewählte Reste sind als Kugel-Stab-Modell gezeigt. In ESp sind L422 und A425 an der Stelle der Verbrückung in  $\beta_{RS8}$  dargestellt (N- und C-Terminus sind im Peptid angezeigt). c, d) Relative K<sub>d</sub>-Werte ( $K_d(f\text{-}ESp)/K_d(f\text{-}\beta_{RSn})$ ) aus den FP-Messungen der Fluorescein-markierten Peptide mit 14-3-3 $\zeta$  (Dreifachmessung, Fehler 1 $\sigma$ , Näheres in den Hintergrundinformationen). e) Finale (2F<sub>0</sub>–F<sub>c</sub>)-Elektronendichte (konturiert bei 1 $\sigma$ ) um die Verbrückung von  $\beta_{SS12}$ . f) Seitenansicht der überlagerten Strukturen von ESp (semitransparent grau) und  $\beta_{SS12}$  (orange) in Bänderdarstellung im Komplex mit 14-3-3 $\zeta$  (graue Oberfläche). Kugel-Stab-Modell analog zu (b).

Betrachtet man aber das  $\alpha$ -C von X<sub>R422</sub>, so sieht man, dass es nicht direkt an der Bindung beteiligt ist und sich daher für eine Konfigurationsänderung eignen könnte. Daraufhin wurde eine Reihe von Peptiden mit zwei S-konfigurierten nichtnatürlichen Aminosäuren und verschiedenen langen Kohlenwasserstoffketten mit 7 bis 13 CH<sub>2</sub>-Gruppen synthetisiert ( $\beta_{SSn}$ ). FP-Messungen ergaben eine starke Abhängigkeit der Bindungsaffinität zu 14-3-3 $\zeta$  von der Brückenlänge (Abbildung 3d). In dieser Serie wiesen lange Brücken mit 10 bis 13 CH<sub>2</sub>-Gruppen den stärksten Anstieg der Affinität (2- bis

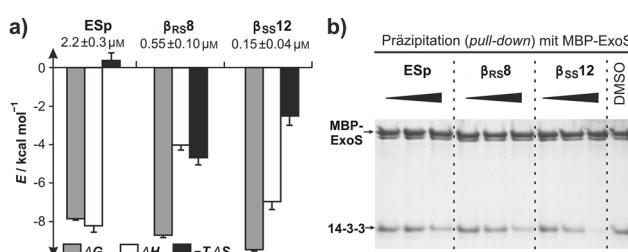
28fach) im Vergleich zu f-ESp auf. Das Peptid f- $\beta_{SS}12$  erwies sich als affinster Binder zu 14-3-3 $\zeta$  ( $K_d = 41 \text{ nm}$ ) mit einer 6fach höheren Affinität als f- $\beta_{RS}8$  und einer 28fach höheren Affinität als f-ESp. Um die strukturellen Auswirkungen der veränderten Verbrückungsarchitektur zu untersuchen, wurde  $\beta_{SS}12$  im Komplex mit 14-3-3 $\zeta$  (aa 1–230) kristallisiert. Die erhaltenen Kristalle streuten bis zu einer Auflösung von 2.5 Å (PDB: 4N84). Die hydrophobe Kohlenwasserstoffbrücke konnte klar zugeordnet werden (Abbildung 3e) und interagiert wieder mit hydrophoben Resten von 14-3-3 $\zeta$  (Abbildung S18). Im Gegensatz zu  $\beta_{RS}8$  ist das Peptidrückgrat von  $\beta_{SS}12$  sehr ähnlich dem von ESp angeordnet, was zu nahezu identischen Interaktionen zwischen 14-3-3 $\zeta$  und dem Leucin L423 von  $\beta_{SS}12$  bzw. ESp führt (Abbildung 3f). Wie bei ESp koordiniert das Rückgrat von  $\beta_{SS}12$  ein Wassermolekül, welches in der Struktur von  $\beta_{RS}8$  fehlt (rot, Abbildung 3b,f sowie Abbildung S20).

Um die FP-Messungen zu validieren und einen Einblick in die Thermodynamik des Bindestoßes zu erhalten, wurden ITC-Messungen mit 14-3-3 $\zeta$  in Anwesenheit von acetylierten Peptiden (ESp,  $\beta_{RS}8$  bzw.  $\beta_{SS}12$ ) durchgeführt (Abbildung 4a). In Übereinstimmung mit den FP-Versuchen wurde  $\beta_{SS}12$  als stärkster Binder ermittelt ( $K_d = 0.15 \mu\text{M}$ ) und zeigte eine 3.7- bzw. 15fach höhere Bindungsaffinität als  $\beta_{RS}8$  ( $K_d = 0.55 \mu\text{M}$ ) bzw. ESp ( $K_d = 2.2 \mu\text{M}$ ) (Abbildung 4a). Ein Vergleich des enthalpischen ( $\Delta H$ , weiß) und entropischen ( $-T\Delta S$ , schwarz) Beitrags zur freien Bindungsenthalpie ( $\Delta G$ , grau) bei 303 K zeigte die geringste Bindungsenthalpie für  $\beta_{RS}8$  ( $\Delta H = -4.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Diese Beobachtung lässt sich mit der Umlagerung des N-terminalen Teils von  $\beta_{RS}8$  und den fehlenden polaren Wechselwirkungen mit 14-3-3 $\zeta$  (Abbildung 3b) erklären. ESp und  $\beta_{SS}12$  bilden dagegen ähnliche Wechselwirkungen mit 14-3-3 $\zeta$  aus, was die vergleichbaren Bindungsenthalpien ( $\Delta H = -8.2$  und  $-7.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) erklären könnte. Die Enthalpie trägt nur geringfügig zur Bindung von ESp an 14-3-3 $\zeta$  bei. Dies deutet darauf hin, dass unterstützende entropische Beiträge wie die Freisetzung von Wassermolekülen (klassischer hydrophober Effekt) auf der einen Seite und ungünstige Anteile wie die konformationelle Einschränkung des Liganden auf der an-

deren Seite sich in etwa die Waage halten. Im Vergleich zu ESp weisen die beiden stabilisierten Peptide deutliche entropische Beiträge auf ( $-T\Delta S = -4.7$  für  $\beta_{RS}8$  und  $-2.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  für  $\beta_{SS}12$ ; Abbildung 4a), was die erhöhten Bindungsaffinitäten erklärt.

Die Einschränkung der konformationellen Freiheit der Peptide durch die Einführung der Kohlenwasserstoffbrücke bietet eine mögliche Erklärung für die verbesserte Bindungsentropie. Um diese Hypothese zu testen, wurden die strukturellen Eigenschaften der Peptide in Lösung untersucht. Als erstes wurden die freien Peptide in Lösung mittels Circulardichroismus (CD) spektroskopisch untersucht. Anhand der Messungen ergab sich für keines der Peptide eine ausgeprägte Sekundärstruktur, jedoch zeigte sich für die cyclisierten Peptide ein reduzierter Anteil flexibler Random-Coil-Strukturen ( $\beta_{RS}8$ : 49%,  $\beta_{SS}12$ : 51%) im Vergleich zu ESp (61%, Tabelle S8). Des Weiteren wurden die  $^1\text{H}$ -Kernspinresonanzen der Rückgratamide (-CO-NH-) ermittelt, welche einen Hinweis auf das Vorhandensein definierter Peptidrückgratstrukturen geben. Üblicherweise zeigen dabei rigide Strukturen eine größere Dispersion der chemischen  $^1\text{HN}$ -Verschiebungen als flexible Strukturen. Wir analysierten die  $^1\text{HN}$ -Resonanzen der Peptide in wässriger Lösung (10% D<sub>2</sub>O) bei pH 6.3 (Abbildung S23). Die bei 288 K aufgenommenen chemischen Verschiebungen des  $^1\text{HN}$ -Rückgrats von ESp zeigten nur eine geringe Dispersion von  $\pm 0.18 \text{ ppm}$  (durchschnittliche chemische Verschiebung:  $\delta = 8.27 \text{ ppm}$ ). Dies weist auf ein konformationell flexibles Rückgrat hin, wobei sich die Anteile von dipolaren Interaktionen mitteln und der  $^1\text{HN}$ -Wert im Bereich des erwarteten Wertes für Random-Coil-Strukturen liegt.<sup>[15]</sup> Demgegenüber zeigen die Resonanzen von  $\beta_{RS}8$  und  $\beta_{SS}12$  eine größere Dispersion mit Werten von  $\pm 0.31$  bzw.  $\pm 0.37 \text{ ppm}$  (durchschnittliche chemische Verschiebung:  $\delta = 8.10$  bzw.  $8.14 \text{ ppm}$ ). Die Ergebnisse weisen damit auf eine erhöhte strukturelle Definition der cyclischen Peptide hin, was die Beobachtungen der vorangegangenen CD- und ITC-Versuche stützt. Es kann dabei jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Änderungen in der chemischen Verschiebung auch von der eingeführten Kohlenwasserstoffbrücke selbst herrühren.

Die modifizierten Peptide mit ihrer erhöhten Bindungsaffinität zu 14-3-3 $\zeta$  wurden anschließend hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Inhibition der Wechselwirkung zwischen dem Virulenzfaktor ExoS und dem humanen 14-3-3 untersucht. Hierzu wurde ein Präzipitationsversuch („pull-down“) mit 14-3-3 $\zeta$  (aa 1–230) und einem MBP-modifizierten (maltose-binding protein) Fragment von ExoS (aa 355–453) (MBP-ExoS) durchgeführt. Der Komplex aus 14-3-3 $\zeta$  und MBP-ExoS wurde mit dem entsprechenden Peptid (ESp,  $\beta_{RS}8$  bzw.  $\beta_{SS}12$ ) inkubiert. Anschließend wurde Amylose-Granulat verwendet, um MBP-ExoS zu immobilisieren. Nach dem Waschen wurden die gebundenen Proteine mittels Gelelektrophorese analysiert (Abbildung 4b). Das Gel zeigt eine Abnahme des Anteils an gebundenem 14-3-3 $\zeta$  mit ansteigender Peptidkonzentration. Die Effizienz zur Inhibition der (14-3-3 $\zeta$ )-ExoS-Interaktion korreliert dabei mit den ermittelten Bindungsaffinitäten und zeigt die stärkste Inhibition durch den besten Binder,  $\beta_{SS}12$ .



**Abbildung 4:** a) Vergleich des enthalpischen ( $\Delta H$ , weiß) und entropischen ( $-T\Delta S$ , schwarz) Anteils zur freien Bindungsenthalpie ( $\Delta G$ , grau) aus den ITC-Messungen bei 303 K (30°C). b) In-vitro-Kompetition von ESp,  $\beta_{RS}8$  bzw.  $\beta_{SS}12$  mit einem N-terminal MBP-modifizierten ExoS-Fragment (aa 355–453) (MBP-ExoS) um die Bindung an 14-3-3 $\zeta$  (aa 1–230). Der MBP-ExoS-(14-3-3 $\zeta$ )-Komplex (2  $\mu\text{M}$ ) wurde mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen (2, 10, 50  $\mu\text{M}$ ) 2 h lang inkubiert. Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Kontrolle. Amylose-Granulat wurde für die Präzipitation (pull-down) verwendet. Nach dem Waschen wurden die gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt.

Wir haben hier eine Strategie vorgestellt, die es ermöglicht, bioaktive Peptide mit irregulärer Sekundärstruktur so zu cyclisieren, dass die verwendeten hydrophoben Brücken direkte Wechselwirkungen mit dem biologischen Zielprotein eingehen. Als Beispielsystem diente der Komplex zwischen dem humanen Adapterprotein 14-3-3 und dem Virulenzfaktor ExoS. Eine Inhibition dieser PPI wird als ein attraktiver antibiotischer Ansatz angesehen.<sup>[13]</sup> Ausgehend vom Interaktionsmotiv von ExoS, einer 11-meren Peptidsequenz, wurde ein makrocyclisches Molekül mit einer etwa 20fach erhöhten Affinität zu 14-3-3 entwickelt. Das modifizierte Peptid ist des Weiteren in der Lage, die Interaktion zwischen 14-3-3 und ExoS *in vitro* zu inhibieren. Die verwendete Verbrückungsarchitektur ist bisher einzigartig und wurde in einem rationalen und iterativen Prozess entwickelt. Wir gehen davon aus, dass dieses Vorgehen allgemein auf die Stabilisierung irregulärer Peptidstrukturen anwendbar ist. Zieht man in Betracht, dass derartige Strukturen in zahlreichen PPIs zu finden sind,<sup>[10]</sup> könnte unser Ansatz zur Entwicklung neuer Peptid-basierter Inhibitoren führen. Darüber hinaus können die resultierenden makrocyclischen Interaktionsmotive ein wichtiger Schritt hin zum rationalen Design von Peptidmimetika<sup>[4,16]</sup> sein, einer Stoffklasse, die die ausgedehnten Oberflächen der Peptide mit den pharmakologischen Vorteilen von niedermolekularen Verbindungen kombiniert.

Eingegangen am 20. November 2013  
Online veröffentlicht am 6. Februar 2014

**Stichwörter:** Cyclische Peptide · Hydrophobe Verbrückung · Protein-Protein-Wechselwirkung · *Pseudomonas aeruginosa* · Ringschlussmetathese

- [1] a) A. J. Wilson, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3289–3300; b) P. Thiel, M. Kaiser, C. Ottmann, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 2052–2059; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2012–2018.
- [2] N. London, B. Raveh, D. Movshovitz-Attias, O. Schueler-Furman, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2010**, *78*, 3140–3149.
- [3] K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, X. Y. Zhang, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5020–5046; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4872–4897.
- [4] V. Azzarito, K. Long, N. S. Murphy, A. J. Wilson, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 161–173.
- [5] a) C. J. White, A. K. Yudin, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 509–524; b) M. Katsara, T. Tseliros, S. Deraos, G. Deraos, M.-T. Matsoukas, E. Lazoura, J. Matsoukas, V. Apostolopoulos, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2221–2232; c) A. Angelini, L. Cendron, S. Y. Chen, J. Touati, G. Winter, G. Zanotti, C. Heinis, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 817–821.
- [6] J. A. Robinson, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1278–1288.
- [7] A. Patgiri, M. Z. Menzenski, A. B. Mahon, P. S. Arora, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1857–1865.
- [8] Y. W. Kim, T. N. Grossmann, G. L. Verdine, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 761–771.
- [9] a) S. Baek, P. S. Kutchukian, G. L. Verdine, R. Huber, T. A. Holak, K. W. Lee, G. M. Popowicz, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 103–106; b) M. L. Stewart, E. Fire, A. E. Keating, L. D. Walensky, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 595–601; c) C. Phillips, L. R. Roberts, M. Schade, R. Bazin, A. Bent, N. L. Davies, R. Moore, A. D. Pannifer, A. R. Pickford, S. H. Prior, C. M. Read, A. Scott, D. G. Brown, B. Xu, S. L. Irving, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9696–9699; d) Y. S. Chang, B. Graves, V. Guerlavais, C. Tovar, K. Packman, K.-H. To, K. A. Olson, K. Kesavan, P. Gangurde, A. Mukherjee, T. Baker, K. Darlak, C. Elkin, Z. Filipovic, F. Z. Qureshi, H. L. Cai, P. Berry, E. Feyfant, X. G. E. Shi, J. Horstick, D. A. Annis, A. M. Manning, N. Fotouhi, H. Nash, L. T. Vassilev, T. K. Sawyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E3445–E3454.
- [10] M. Guharoy, P. Chakrabarti, *Bioinformatics* **2007**, *23*, 1909–1918.
- [11] G. M. Rossolini, E. Mantengoli, *Clin. Microbiol. Infect.* **2005**, *11*, 17–32.
- [12] a) G. H. Talbot, J. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, M. Scheld, J. G. Bartlett, *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, 657–668; b) N. Srinivas, P. Jetter, B. J. Ueberbacher, M. Werneburg, K. Zerbe, J. Steinmann, B. Van der Meijden, F. Bernardini, A. Lederer, R. L. A. Dias, P. E. Misson, H. Henze, J. Zumbrunn, F. O. Gombert, D. Obrecht, P. Hunziker, S. Schauer, U. Ziegler, A. Kaech, L. Eberl, K. Riedel, S. J. DeMarco, J. A. Robinson, *Science* **2010**, *327*, 1010–1013; c) A. Bernardi, J. Jiménez-Barbero, A. Casnati, C. De Castro, T. Darbre, F. Fieschi, J. Finne, H. Funken, K.-E. Jaeger, M. Lahmann, T. K. Lindhorst, M. Marradi, P. Messner, A. Molinaro, P. V. Murphy, C. Nativi, S. Oscarson, S. Penades, F. Peri, R. J. Pieters, O. Renaudet, J.-L. Reymond, B. Richichi, J. Rojo, F. Sansone, C. Schaeffer, W. B. Turnbull, T. Velasco-Torrijos, S. Vidal, S. Vincent, T. Wennekes, H. Zuilhof, A. Imberty, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4709–4727.
- [13] C. Ottmann, L. Yasmin, M. Weyand, J. L. Veesenmeyer, M. H. Diaz, R. H. Palmer, M. S. Francis, A. R. Hauser, A. Wittinghofer, B. Hallberg, *EMBO J.* **2007**, *26*, 902–913.
- [14] L. Yasmin, J. L. Veesenmeyer, M. H. Diaz, M. S. Francis, C. Ottmann, R. H. Palmer, A. R. Hauser, B. Hallberg, *Biochem. J.* **2010**, *427*, 217–224.
- [15] a) C. C. McDonald, W. D. Phillips, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 6332–6341; b) R. Page, W. Peti, I. A. Wilson, R. C. Stevens, K. Wuthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1901–1905.
- [16] E. Ko, J. Liu, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4411–4421.