

Zur Architektur von Peptiden: Bestimmung der relativen Stabilität von parallelen und antiparallelen β -Faltblättern**

Kenji Kobayashi, Juan R. Granja und
M. Reza Ghadiri*

In memoriam Linus C. Pauling

Unter den am häufigsten vorkommenden Protein-Sekundärstrukturen gehören β -Faltblätter zu den am wenigsten untersuchten, da gut charakterisierte Peptidmodelle fehlen^[1–3]. Trotz einiger theoretischer Ansätze, bei denen die mögliche Bedeutung der Aminosäurereste sowie der Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten unterschiedlicher Stränge für die Ausprägung der Faltungseigenschaften der β -Faltblätter diskutiert wird^[4], gibt es bislang keine experimentellen Befunde zur Klärung der energetischen Faktoren, die die Bildung von parallelen und antiparallelen Anordnungen begünstigen. Hier beschreiben wir das Design, die Synthese und die Charakterisierung eines neuartigen β -Faltblattmodells sowie die erste direkte energetische Abschätzung für die thermodynamisch bevorzugte Bildung der antiparallelen Struktur. Im Rahmen dieses Modells belegen unsere Untersuchungen erstmals die erhebliche Bedeutung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidgerüsten bei der Bildung des antiparallelen β -Faltblatts.

Das De-novo-Design von Peptiden mit gut definierten β -Faltblättern wurde hauptsächlich dadurch erschwert, daß die hydrophoben oder amphiphilen Polypeptide zu nichtspezifischer intermolekularer Aggregation neigen, daß der Faltblatttyp nicht festgelegt und das Maß der Drehung des Peptidrückgrats in solchen Strukturen weder vorhergesagt noch kontrolliert werden kann^[5]. Darüber hinaus gibt es bislang keine Untersuchung zur Bildung von parallelen und antiparallelen β -Faltblättern aus Peptiden mit gleichen oder ähnlichen Sequenzen, so daß die Bedeutung von Wechselwirkungen zwischen den Peptidgerüsten und zwischen den Seitenketten unterschiedlicher Stränge in solchen Anordnungen nicht abgeschätzt werden kann. In der vorhergehenden Zuschrift haben wir das Design einer zylindrischen Anordnung antiparalleler β -Faltblätter auf der Grundlage der Selbstorganisation von spezifisch N-blockierten, planaren cyclischen Peptiden beschrieben^[6]. Bei dieser besonderen β -Faltblattanordnung bestehen die genannten Komplikationen, die β -Faltblattmodellen in der Regel anhaften, nicht, so daß unser Modell eine gute Grundlage für die Untersuchung der maßgeblichen Wechselwirkungen bei der Bildung von Peptidassoziaten ist.

Die cyclischen Octapeptide *cyclo*[(L-Phe-*N*²-Me-D-Ala)₄]-**1**, *cyclo*[(D-Phe-*N*²-Me-L-Ala)₄]-**2** und *cyclo*[(L-Phe-*N*²-Me-D-Ala-L-Leu-*N*²-Me-D-Ala)₂]-**3** weisen die folgenden gemeinsamen Konstruktionsprinzipien auf: Die Peptide sind aus sich abwechselnden D- und L-Aminosäuren aufgebaut, haben in apolaren organischen Lösungsmitteln eine planare, ringförmige Konformation und stapeln sich unter Bildung von zylindrischen β -Faltblättern^[6, 7]. ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchun-

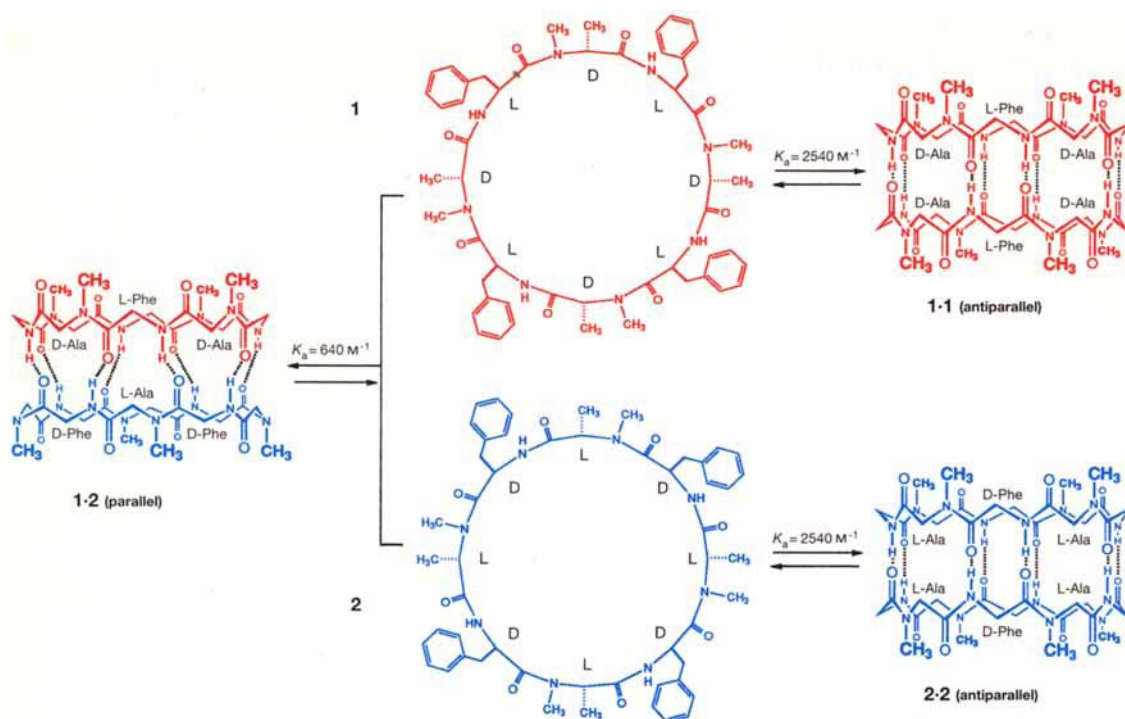
gen in Lösung sowie hochauflösende Kristallstrukturanalysen ergaben, daß sämtliche ϕ - und ψ -Diederwinkel in den zulässigen Bereichen des Ramachandran-Diagramms für β -Faltblätter liegen^[8]. Die Peptide **1–3** erfüllen zwei Kriterien, die für die Steuerung der Bildung von parallelen und/oder antiparallelen β -Faltblättern wesentlich sind: Die Seite des Peptidstrangs, auf der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Gerüsten gebildet werden können, und der Faltblatttyp, durch den die nächsten Nachbarn der nebeneinanderliegenden Stränge definiert werden, können eindeutig festgelegt werden. Die Seitenselektivität wird durch selektive N-Methylierung von Amidfunktionalitäten im Gerüst gesteuert, so daß intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen auf einer Seite des Peptidrings nicht mehr möglich sind. Die Kontrolle über den Faltblatttyp ergibt sich direkt aus der abwechselnden Folge von D- und L-Konfigurationen im Gerüst, wodurch die Struktur des β -Faltblatts so eingeschränkt wird, daß zwischen den beiden Strängen nur Paare homochiraler Aminosäurereste gebildet werden können. Diese Einschränkung folgt aus der erforderlichen Anordnung der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen, die bestimmt wird durch die Nachbarschaft von Amid-Wasserstoffbrückenbindungs-Donoren und -Acceptoren sowie durch die beim anderen Faltblatttyp und bei anderen Anordnungen der Seitenketten auftretenden, großen sterischen Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten und dem Gerüst. Daher können enantiomerenreine Peptide, wie **1–3**, nur homodimere, antiparallele β -Faltblätter und zueinander enantiomere Peptide nur heterodimere, parallele β -Faltblätter bilden.

Nach diesen grundlegenden Überlegungen gingen wir daran, die relative Stabilität von parallelen und antiparallelen β -Faltblättern anhand der beiden enantiomeren Peptide **1** und **2** zu bestimmen. Im Racemat liegen im Gleichgewicht **1·2** mit einer parallelen Anordnung sowie **1·1** und **2·2** mit zueinander enantiomeren antiparallelen β -Faltblättern vor (Schema 1). Die Bildung der Diastereomere **1·2** und **1·1/2·2** kann ¹H-NMR-spektroskopisch leicht verfolgt werden. Wie wir gezeigt haben, organisieren sich die Peptide **1** und **2** in apolaren organischen Lösungsmitteln jeweils unter Bildung des erwarteten antiparallelen β -Faltblatts selbst^[6]. Die Strukturparameter und einige thermodynamische Eigenschaften dieses β -Faltblatts wurden durch hochauflösende Kristallstrukturanalyse sowie 1D- und 2D-¹H-NMR-spektroskopisch bestimmt. Diagnostisch sehr hilfreich ist das Signal des an der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindung beteiligten NH-Protons bei $\delta = 8.73$ ($J_{\text{NH, aH}} = 8.8$ Hz) in den ¹H-NMR-Spektren der Peptide **1** und **2**, da es die Bildung des antiparallelen β -Faltblatts kennzeichnet (vgl. NH-Signal des monomeren Peptids bei $\delta = 6.98$, $J_{\text{NH, aH}} = 7.5$ Hz; Abb. 1a). Das Spektrum einer äquimolaren Mischung aus **1** und **2** weist außer den bereits zugeordneten Signalen für die Dimere **1·1** und **2·2** mit antiparallelen Anordnungen einen neuen Satz von Signalen für **1·2** mit paralleler Anordnung auf^[9]. Das NH-Signal im Spektrum von **1·2** liegt bei $\delta = 8.49$ ($J_{\text{NH, aH}} = 8.8$ Hz), d. h. die Konformationen der Gerüste sind in den parallelen und antiparallelen β -Faltblättern ähnlich (Abb. 1b). Aus der relativen Intensität der ¹H-NMR-Signale wurde die Gibbs-Energie der beiden β -Faltblätter bestimmt. Danach ist die antiparallele Form ($\Delta G_{293} = 4.56$ kcal mol⁻¹, $K_a(\text{CDCl}_3) = 2540$ M⁻¹ bei 293 K)^[6] 0.8 kcal mol⁻¹ stabiler als die parallele ($\Delta G_{293} = 3.76$ kcal mol⁻¹, $K_a(\text{CDCl}_3) = 640$ M⁻¹ bei 293 K).

Eine wichtige Frage ist, ob diese Stabilitätsdifferenz auf die unterschiedlichen Bindungsverhältnisse beiden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidgerüsten oder auf unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der beiden Peptidstränge zurückzuführen ist^[4].

[*] Prof. M. R. Ghadiri, Dr. K. Kobayashi, Dr. J. R. Granja
Departments of Chemistry and Molecular Biology
The Scripps Research Institute
10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Telefax: Int. + 619/554-6656

[**] Diese Arbeit wurde vom US Office of Naval Research und vom National Institute of General Medicine gefördert. K. K. dankt dem japanischen Ministerium für Erziehung, Wissenschaft und Kultur für ein Postdoktorandenstipendium, J. R. G. der NSCORT für ein Stipendium. Wir danken D.-H. Huang und M. A. Case für die NMR-spektroskopischen Messungen.



Mit dem Peptid **3** sollte es möglich sein, die Ursache der Strukturselektivität herauszufinden. Es enthält neben Phenylalanin- und Alaninresten zwei Leucinreste, durch die die Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten unterschiedlicher Stränge verstärkt werden. Anders als die Strukturen von **1** und **2** weist die von **3** nicht eine vierzählige, sondern eine zweizählige Drehachse senkrecht zur Ebene des Rings auf^[10]. Infolgedessen gibt es zwei diastereomere antiparallele β -Faltblätter **3a** und **3b**, wobei bei **3a** zwischen den beiden Strängen die Paare D-Ala...D-Ala, L-Leu...L-Leu und L-Phe...L-Phe sowie bei **3b** die Paare D-Ala...D-Ala und L-Leu...L-Phe gebildet werden (Schema 2). Wenn die Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der beiden Peptidstränge bei **3a** und bei **3b** für die Asso-

ziatbildung wesentlich sind, sollte eines dieser Diastereomere bevorzugt sein^[10]. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **3** weist für **3a** und **3b** je einen Satz von Signalen auf; aus den Signalintensitäten folgt, daß **3a** und **3b** nahezu äquimolar vorliegen (Abb. 1c)^[11]. Dies bedeutet, daß die Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten (ca. 50 cal mol⁻¹ bei 293 K) nicht

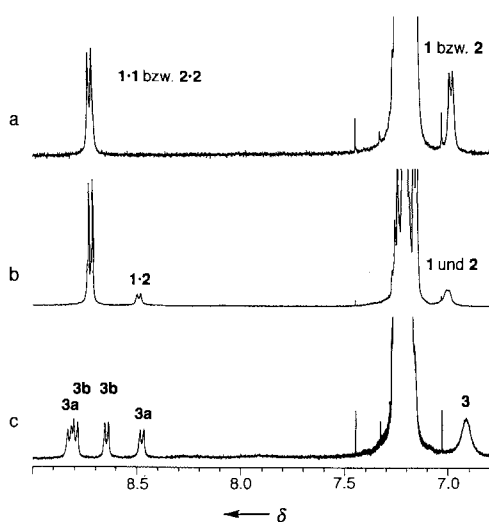
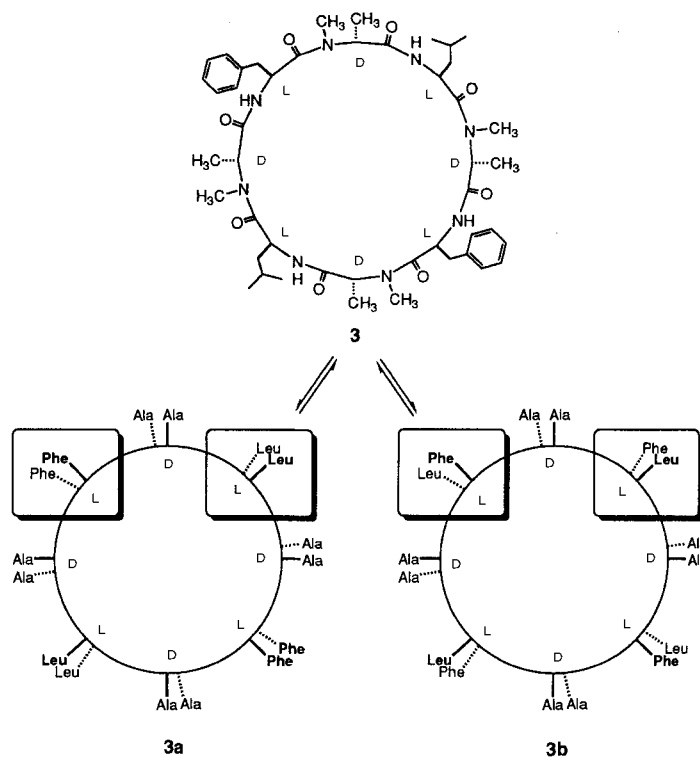


Abb. 1. NH-Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz, CDCl_3 , 293 K) von a) **1** und **2** (1 mM), b) einem racemischen Gemisch aus **1** und **2** (10 mM) und c) **3** (3.0 mM). Die Zuordnungen ergeben sich aus den Ergebnissen von ROESY-Messungen [6]. $\delta(1) = \delta(2) = 6.98$ (NH), $\delta(3) = 6.92$, $\delta(1\cdot1) = \delta(2\cdot2) = 8.73$, $\delta(3a) = 8.48, 8.83$, $\delta(3b) = 8.65, 8.80$, $\delta(1\cdot2) = 8.49$. Bei diesen β -Faltblättern beträgt $J(\text{NH}, \alpha\text{H}) = 8.8$ Hz.



Schema 2. Schematische Darstellung der Selbstorganisation von **3** unter Bildung der diastereomeren Dimere **3a** und **3b** mit antiparallelen β -Faltblattanordnungen (die Aminosäureseitenketten des oberen Cyclen sind durch dicke, die des unteren durch gestrichelte Linien gekennzeichnet). **3a** und **3b** unterscheiden sich in der Position der Leu- und Phe-Seitenketten (eingekästelt).

signifikant zur Stabilisierung der Struktur beitragen, was auch wegen der Hydrophobie der Seitenketten und der verwendeten apolaren Lösungsmittel erwartet wurde. Die thermodynamische Bevorzugung der antiparallelen Struktur spiegelt also die bei den beiden β -Faltblatttypen unterschiedlichen Erkennungsmuster bei der Wechselwirkung zwischen den Peptidgerüsten wider.

Unsere Untersuchung liefert das erste durchgängig charakterisierte β -Faltblattmodell für die Abschätzung der Beiträge von Wechselwirkungen zwischen den Peptidgerüsten und solchen zwischen den Seitenketten bei der Bildung von parallelen und antiparallelen β -Faltblättern. Änderungen der Polarität des Mediums sollten zu signifikanten additiven Energiebeiträgen infolge von Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten benachbarter Stränge führen, so daß auch hierdurch eine der β -Faltblattanordnungen stabilisiert wird. Durch einfache Modelle wie das vorliegende sollten nun die Faktoren, die die Faltung von Peptiden begünstigen, detailliert charakterisiert werden können.

Eingegangen am 5. September 1994 [Z 7292]

Stichworte: Peptide · Selbstorganisation · β -Faltblattstrukturen

- [1] a) L. Pauling, R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1951**, *37*, 251–256; b) *ibid.* **1953**, *39*, 253–256; c) F. R. Salemme, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **1983**, *42*, 95–133.
- [2] a) C. A. Kim, J. M. Berg, *Nature (London)* **1993**, *362*, 267–270; b) D. L. Minor, Jr., P. S. Kim, *ibid.* **1994**, *367*, 660–663; c) K. K. Smith, J. M. Withka, L. Regan, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5510–5517.
- [3] a) J. S. Balcerski, E. S. Pysh, G. M. Bonora, C. Toniolo, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3470–3473; b) D. S. Kemp, B. R. Bowen, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5081–5082; c) D. S. Kemp, B. R. Bowen, C. C. Muendel, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4650–4657; d) K. Y. Tsang, H. Diaz, N. Graciani, J. W. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3988–4005.
- [4] a) K.-C. Chou, G. Némethy, H. A. Scheraga, *Biochemistry* **1983**, *22*, 6213–6221; b) S. Lifson, C. Sander, *Nature (London)* **1979**, *282*, 109–111; c) K.-C. Chou, G. Némethy, H. A. Scheraga, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 134–141.
- [5] a) G. Seipke, H. A. Arfmann, K. G. Wagner, *Biopolymers* **1974**, *13*, 1621–1633; b) A. Brack, L. Orgel, *Nature (London)* **1975**, *256*, 383–387; c) S. S. Pierree, R. T. Ingwall, M. S. Varlander, M. Goodman, *Biopolymers* **1978**, *17*, 1837–1847; d) D. G. Osterman, E. T. Kaiser, *J. Cell. Biochem.* **1985**, *29*, 57–72; e) K.-H. Altmann, A. Flörshemer, M. Mutter, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27*, 314–319; e) M. Mutter, R. Gassmann, U. Buttke, K.-H. Altmann, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1504–1506; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1514–1516; f) S. Zhang, T. Holmes, C. Lockshin, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3334–3338.
- [6] M. R. Ghadiri, K. Kobayashi, J. R. Granja, R. K. Chadha, D. E. McRee, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 76–78; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, Nr. 1.
- [7] a) M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, *Nature (London)* **1993**, *366*, 324–327; b) M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *ibid.* **1994**, *369*, 301–304; c) N. Khazanovich, J. R. Granja, D. E. McRee, R. A. Milligan, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6011–6012.
- [8] Torsionswinkel der cyclischen Peptidstruktur: $\phi = -128.4$ und $\psi = 126.7^\circ$ für Phe sowie $\phi = 131.5$ und $\psi = -146.2^\circ$ für Ala.
- [9] 1·2 wurde durch Austausch- und NOE-Kreuzsignale im ROESY-NMR-Spektrum charakterisiert. Die dimere Struktur wurde durch Markierungsversuche mit Deuterium eindeutig bestätigt. Die Amidprotonen von 1 wurden zunächst gegen Deuterium ausgetauscht ($96 \pm 2\%$ Einbau), und dann wurde 1 mit einer äquimolaren Menge an 2 gemischt. Die NH-Signalintensität im ^1H -NMR-Spektrum ist um $(50 \pm 4)\%$ verringert (Vergleich der Intensität des NH-Signals mit denen der α -, β - und Seitenkettenprotonen).
- [10] Die enantiomeren Peptide 1 und 2 können wegen der vierzähligen Drehachse senkrecht zur Ebene des Rings jeweils nur ein antiparalleles β -Faltblatt bilden (vier äquivalente Wasserstoffbrückenbindungspositionen), bei dem zwischen den beiden Peptidsträngen Ala...Ala- und Phe...Phe-Paare auftreten. Beim Peptid 3, dessen Struktur eine nur zweizählige Drehachse aufweist, sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidgerüsten in beiden Diastereomeren β -Faltblattanordnungen gleich groß, so daß die relative Population der beiden Diastereomere durch die unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der beiden Stränge bestimmt wird.
- [11] Die NMR-Signale wurden entsprechend den Ergebnissen von ROESY-Messungen zugeordnet. Durch die ^1H -NMR-Untersuchungen wird belegt, daß ein $48:52(\pm 0.5)\%$ -Gemisch aus den beiden Diastereomeren gebildet wird ($\Delta\Delta G_{293} = (48 \pm 14) \text{ cal mol}^{-1}$). Wir konnten die Sätze von Signalen allerdings nicht mit Sicherheit den Diastereomeren 3a und 3b zuordnen; unsere Zuordnung (Abb. 2c) ist daher willkürlich.

Die Stabilisierung des Rb^- -Ions in $\text{Na}_{16}\text{Rb}_7\text{Sb}_7 = \text{Na}_{16}(\text{RbRb}_6)\text{Sb}_7^{**}$

Hans Georg von Schnering*, Raúl Hector Cardoso Gil, Wolfgang Hönle, Armin Burkhardt*, Georges Krier und Ole Krogh Andersen

Professor Manuel Cardona zum 60. Geburtstag gewidmet

Wir haben die binären Verbindungen der Alkalimetalle mit den Elementen der fünften Hauptgruppe (Pnictide M_3X) nochmals untersucht^[1], weil über Einzelheiten dieser einfachen Strukturen sehr kontroverse Angaben existieren (exakte Zusammensetzung, Überstrukturen, Symmetrie). Dabei wurde auch die Synthese ternärer Verbindungen versucht, da in den Strukturtypen Li_3Bi und Na_3As die E1-Atome jeweils zwei strukturell unterschiedliche Positionen im Verhältnis 2:1 besetzen. Sowohl Na_3Sb als auch Rb_3Sb kristallisieren im hexagonalen Na_3As -Typ. Die Synthese von „ Na_2RbSb “ sollte nun zeigen, ob und wie sich die Struktur dem Größenunterschied von Na und Rb anpassen kann.

Bei der Synthese entsteht jedoch $\text{Na}_{16}\text{Rb}_7\text{Sb}_7 \cong \text{Na}_{2,29}\text{RbSb}$ in Form spröder, metallisch glänzender, silberfarbener Kuboktaeder^[2]. Die Charakterisierung erfolgte durch chemische Analyse^[3], Strukturbestimmung^[4], Messung der elektrischen Leitfähigkeit^[5], kristallchemische Überlegungen sowie quantenchemische Rechnungen. Die Verbindung ist ein Halbleiter mit $E_g = 0.33 \text{ eV}$. Sie zersetzt sich an Luft sehr schnell zu grauen, noch nicht näher charakterisierten Produkten. Schon die Zusammensetzung zeigt, daß eine ungewöhnliche Elektronenverteilung vorliegen muß, denn in einem halbleitenden Antimonid sollten alle Valenzelektronen unter Bildung formaler Sb^{3-} -Ionen lokalisiert sein, wofür aber in $\text{Na}_{16}\text{Rb}_7\text{Sb}_7$ nur 21 der 23 Elektronen der Alkalimetallatome benötigt werden.

$\text{Na}_{16}\text{Rb}_7\text{Sb}_7$ kristallisiert kubisch in der Raumgruppe $Fm\bar{3}m$ (Nr. 225) isotyp zu $\text{Sc}_{11}\text{Ir}_4$ ^[6] und ist die erste Hauptgruppenelementverbindung zu diesem $cF120$ -Strukturtyp. Die Struktur hat auch Ähnlichkeit mit dem Li_3Bi -Typ ($a' = 2a$), wie folgender Vergleich zeigt: $[(\text{Li}_6)(\text{Bi}_6)]_4 \cong [(\text{Na}_{16})(\text{Rb}_6\Box_2)(\text{Sb}_7\text{Rb})_4] \cong [(\text{Sc}_{16})(\text{Sc}_6\Box_2)(\text{Ir}_8)]_4$. Die Li_3Bi -Struktur wird aus kondensierten Bi_{12} -Kuboktaedern aufgebaut, jeweils zentriert von einem weiteren Bi-Atom, das von einem Li_8 -Würfel eingehüllt ist ($\text{Bi}_{12/4}\text{BiLi}_8$). Die restlichen Li-Atome ($\text{Li}_{8/8} + \text{Li}_{6/2}$) liegen in den Oktaederlücken der Bi-Packung. In der $cF120$ -Struktur von $\text{Na}_{16}\text{Rb}_7\text{Sb}_7$ bilden sechs der Sb-Atome das Raumnetz kondensierter Sb_{12} -Kuboktaeder, von denen aber nur jeder zweite durch das siebente Sb-Atom, umgeben von einem Na_8 -Würfel, ausgefüllt wird. In den anderen Kuboktaedern befinden sich jetzt Rb_6 -Oktaeder, in deren Zentren (statt eines Sb-Atoms) jeweils ein siebentes Rb-Atom liegt. Dieses zentrierte $[\text{RbRb}_6]$ -Oktaeder wird zwar ebenfalls von acht Na-Atomen umgeben, diese sind aber in der periphere Hülle des Sb_{12} -Kuboktaeders verschoben, nämlich in dessen acht Dreiecksflächen. Durch diese Verschiebung werden auch gerade die Defekte im Vergleich zur ursprünglichen Li_3Bi -Struktur erzwungen: $[(\text{Li}_8)(\text{Li}_{8/8}\text{Li}_{6/2})(\text{Bi}_{12/4}\text{Bi})] + [(\text{Li}_8)(\text{Li}_{8/8}\text{Li}_{6/2})(\text{Bi}_{12/4}\text{Bi})] \rightarrow [(\text{Na}_8)(\Box\Box_3)(\text{Sb}_{12/4}\text{Sb})] + [(\text{Na}_8)(\Box\text{Rb}_6)(\text{Sb}_{12/4}\text{Rb})]$. Aufbau und Elektronenverteilung werden unmittelbar mit der An-

[*] Prof. Dr. H. G. von Schnering, Dr. R. H. Cardoso Gil, Dr. W. Hönle, Dr. A. Burkhardt, Dr. G. Krier, Prof. O. K. Andersen
Max-Planck-Institut für Festkörperforschung
Heisenbergstraße 1, D-70569 Stuttgart

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Dank gebührt auch Andreas Savin, Olle Gunnarsson, Volker Eyert und Ove Jepsen für hilfreiche Diskussionsbeiträge sowie Yuri Grin und Ortrud Buresch für die Polyederdarstellung bzw. chemische Analysen.