

Das Redoxpotential von Selenocystin in konformativ nicht eingeschränkten cyclischen Peptiden**

Dörthe Besse, Frank Siedler, Tammo Diercks,
Horst Kessler und Luis Moroder*

Selenocystein (Sec) kann, bezogen auf die ribosomenvermittelte Proteinsynthese, als die 21. Aminosäure betrachtet werden.^[1, 2] Es kommt in vielen prokaryontischen und eukaryontischen Proteinen vor, wobei die Natur das UGA-Stopcodon zum Einfügen dieser Selenoaminoäure verwendet statt eines posttranslationalen Modifikationsmechanismus. Die meisten der bislang identifizierten Selenoproteine sind Redoxenzyme, die wegen des niedrigen pK_a -Werts der Selenolfunktion (5.73 für Sec, 8.53 für Cys) einzigartige biochemische Eigenschaften aufweisen. Das Redoxpotential von Selenocystin sowie von Selenocystin enthaltenden Peptiden und Proteinen ist allerdings noch nicht bekannt. Wir haben daher das Redoxpotential von Selenocystin in Peptiden mit dem stark reduzierenden Dithiol Dithiothreit (DTT) als Referenzredoxsystem gemessen.

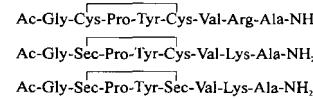
Frühere Studien an aliphatischen und aromatischen Selenolen haben ergeben, daß die hohe Acidität und damit die hohe Nucleophilie der Selenolfunktion die Ursache für die katalytische Aktivität der Selenole in Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen mit stark reduzierenden Thiolen sind.^[3] Diese Redoxaktivität erfordert eine Regeneration des katalytischen Selenols aus dem Diselenid. Tatsächlich werden Diselenide von stark reduzierenden Dithiolen wie DTT in wässriger Lösung bei pH 7.6 reduziert,^[4] während Monothiole ein Diselenid nicht zu reduzieren vermögen.^[3] Dies konnte im Fall eines Selenocystin enthaltenden Peptiddimers bestätigt werden, das mit einem 10³fachen Überschuß an Glutathion bei pH 7.6 nur teilweise reduziert wurde.^[5] Doch diese partielle Reduktion durch Glutathion ist offensichtlich ausreichend, um in lebenden Zellen eine Konzentration an Selenocystein aufrecht zu erhalten, die genügt, um dessen Bioinkorporation in Selenoproteine zu ermöglichen. Tatsächlich konnte kürzlich unter Verwendung von Selenocystin im Wachstumsmedium von cysteinauxotrophem *E. coli* das [Sec³², Sec³⁵]-Analogon des Thioredoxins, einer Thiolprotein-Oxidoreduktase, effizient exprimiert werden.^[2] Die Redoxeigenschaften dieser Thioredoxinmutante unterscheiden sich deutlich von denen des ursprünglichen Cysteinproteins. Es kann nur durch NaBH₄ oder DTT in großem Überschuß reduziert werden, während im Fall der gemischten [Sec³², Cys³⁵]- und [Cys³², Sec³⁵]-Thioredoxine eine partielle Reduktion bereits mit β -Sulfanylethanol erreicht wurde. Diese Ergebnisse führten Müller et al.^[2] dazu, für Sec, Sec-Thioredoxin ein Redoxpotential zwischen dem des Thioredoxins (−270 mV)^[6] und dem von DTT (−323 mV)^[7] zu postulieren.

In früheren Studien untersuchten wir anhand des Glutathion-Systems als Referenzredoxpuffer das Redoxpotential der acht Aminosäuren umfassenden Aktivzentrenfragmente von Thiolprotein-Oxidoreduktasen, die alle das charakteristische Cys-Xaa-Yaa-Cys-Sequenzmotiv enthalten.^[8] Ein Vergleich der räumlichen Strukturen der oxidierten Fragmente mit denen der

Aktivzentren der Ursprungsproteine zeigte deutlich, daß die disulfidverbrückte cyclische Struktur des Aktivzentrums in Glutaredoxin am wenigsten von der dreidimensionalen Faltung des Enzyms beeinflußt wird; sie wird im wesentlichen von der lokalen konformativen Präferenz der Disulfidschleife bestimmt.^[9, 10] Entsprechend sind die Redoxpotentiale des Glutaredoxins und des entsprechenden Aktivzentrenfragments grx-[10–17] sehr ähnlich und diese Verbindungen somit nur wenig reduzierender als Disulfiddimere wie Glutathion.^[8] Mit Blick auf diese Ergebnisse verwendeten wir das Cys, Cys-Octapeptid des Glutaredoxins zur Bestimmung des Redoxpotentials von Selenocystein in einem strukturell nicht eingeschränkten diselenidverbrückten linearen Peptid.

Um die Synthese der Sec-Peptide [Sec¹¹, Sec¹⁴]- und [Sec¹¹, Cys¹⁴]-grx-[10–17] (Schema 1) zu vereinfachen, wurde der Arg16-Rest durch Lys ersetzt; die Methoxybenzylgruppe wurde zum Schutz der Selenolfunktion eingesetzt und die Se-Se- und S-S-Brücken wurden mit Dimethylsulfoxid(DMSO)/Trifluoressigsäure^[10, 11] aufgebaut. Das ⁷⁷Se-NMR-Spektrum (DMSO, 300 K) des [Sec¹¹, Sec¹⁴, Lys¹⁶]-grx-[10–17] Fragments in der oxidierten Form zeigt ein intensives Signal bei δ = 266.6, während in Gegenwart von DTT in großem Überschuß (10³fach) zwei Signale nahezu gleicher Intensität bei δ = −176.2 und −190.6 detektiert werden. Damit konnte sowohl die quantitative Reduktion der Diselenidbrücke mit DTT als auch die Abwesenheit gemischter Se-S-Spezies durch Einwirkung des reduzierenden Sulfanyls in Übereinstimmung mit den berichteten Ergebnissen für Alkandiselenide^[3] nachgewiesen werden.

Versuche, die Redoxpotentiale der Sec-Peptide mit DTT als Referenzredoxsystem über die Umkehrphasen-HPLC-chromatographische Quantifizierung der einzelnen im Gleichgewicht vorhandenen Spezies zu bestimmen, wie wir es bereits für das Glutaredoxinfragment grx-[10–17] beschrieben haben,^[8] scheiterten an teils irreversibler Adsorption der reduzierten Sec-Peptide an der Umkehrphasen-Matrix. Auch die Bestimmung durch NMR-spektroskopische Quantifizierung der oxidierten und reduzierten Spezien in Analogie zu der von Houk und Whitesides beschriebenen Methode^[12] konnte wegen der geringen natürlichen Häufigkeit von ⁷⁷Se und den damit verbundenen langen Meßzeiten, über die das Redoxsystem im Gleichgewicht gehalten werden muß, nicht verwendet werden. Die Fluoreszenz des Tyrosins wird durch die reduktive Disulfidringöffnung nicht beeinflußt, doch unterscheiden sich die CD-Spektren des reduzierten und des oxidierten grx-[10–17] deutlich voneinander. So konnten die Circulardichroismus-Intensitäten bei 230 nm verwendet werden, um die Konzentrationen an reduzierten und oxidierten Spezien aufzuzeichnen. Die Auftragung des Anteils X_{ox} an oxidierten Spezien gegen die Konzentration an DTT (Abb. 1) zeigt, daß bei pH 7.0 und 20 °C für eine 50proz. Reduktion des [Cys¹¹, Cys¹⁴]-, des [Sec¹¹, Cys¹⁴]- und des [Sec¹¹, Cys¹⁴]-Octapeptids molare DTT/Peptid-Verhältnisse von 0.5, 1.15 bzw. 44 benötigt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die hohe Stabilität der Diselenidbrücke gegenüber Austauschreaktionen mit Thiolen, während die Se-S-Brücke in reduzierenden Medien deutlich schwächer zu sein scheint. Da die CD-Spektren, die bei unterschiedlichen DTT-Konzentrationen aufgenommen wurden, über einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten unverändert bleiben, kann dieses System als im Gleich-



Schema 1. Primärstruktur des Aktivzentrumfragments grx-[10–17] von Glutaredoxin und der Selenocystein-analoga [Sec¹¹, Cys¹⁴, Lys¹⁶]- und [Sec¹¹, Cys¹⁴, Lys¹⁶]-grx-[10–17].

* Prof. Dr. L. Moroder, Dipl.-Chem. D. Besse, Dr. F. Siedler
Max-Planck-Institut für Biochemie, AG Bioorganische Chemie
Am Klopferspitz 18A, D-82152 Martinsried
Telefax: Int. + 89/85782847
E-mail: moroder@biochem.mpg.de.

Dipl.-Chem. T. Diercks, Prof. Dr. H. Kessler
Institut für Organische Chemie und Biochemie
Technische Universität München, D-85747 Garching

** Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (Mo 377/7-1).

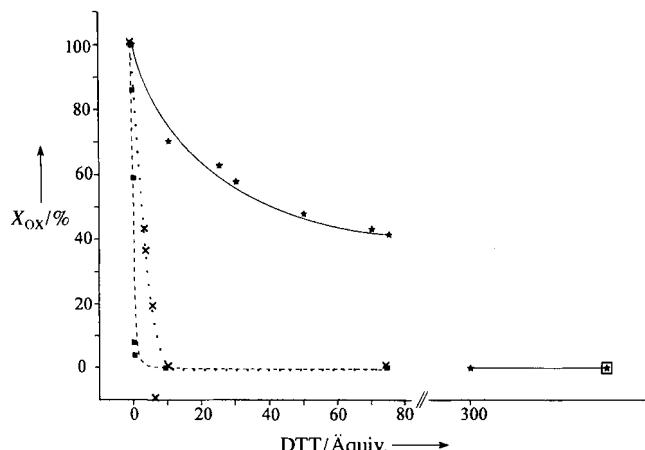


Abb. 1. Durch Circulardichroismusmessungen bei 230 nm verfolgte Reduktion von $[\text{Cys}^{11}, \text{Cys}^{14}]$ - (■), $[\text{Sec}^{11}, \text{Cys}^{14}, \text{Lys}^{16}]$ - (×) und $[\text{Sec}^{11}, \text{Sec}^{14}, \text{Lys}^{16}]$ -grx-[10–17] (*) in der oxidierten, cyclischen Form mit DTT in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0) bei 20 °C; □: nach quantitativer Reduktion mit NaBH_4 .

gewicht befindlich betrachtet werden. Es ist damit die Voraussetzung für die Bestimmung der K_{ox} -Werte gegeben [Gl. (1), (2);

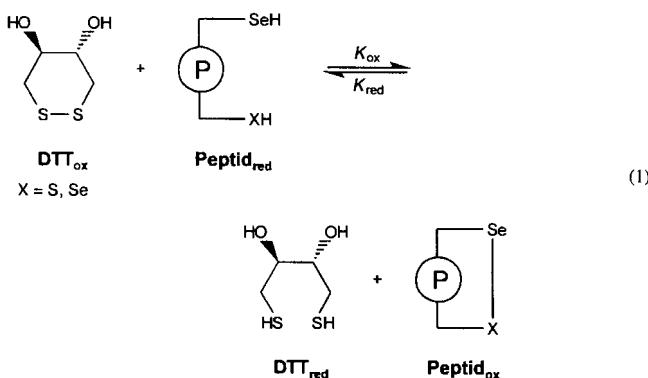


Tabelle 1]. Diese wurden unter Verwendung der Nernst-Gleichung (3) mit $E_0 = -323 \text{ mV}$ (pH 7.0) und -366 mV (pH 8.1)

$$K_{\text{ox}} = \frac{[\text{Peptid}_{\text{ox}}][\text{DTT}_{\text{red}}]}{[\text{Peptid}_{\text{red}}][\text{DTT}_{\text{ox}}]} \quad (2)$$

$$E = E_0(\text{Reduktand}) - 0.03 \log K_{\text{ox}} \quad (3)$$

für DTT^[7] in die entsprechenden Redoxpotentiale umgerechnet. Wegen der relativ leichten Reduktion der gemischten Se-S-Brücke im $[\text{Sec}^{11}, \text{Cys}^{14}]$ -Octapeptid mit DTT und damit even-

Tabelle 1. Gleichgewichtskonstanten der Oxidation (K_{ox}) der Cys,Cys-, Sec,Sec- und Sec,Cys-Peptide mit Thiolen [Gl. (1), (2)] [a].

Peptid	Red.-mittel	K_{ox}	
		pH 7.0	pH 8.5
grx-[10–17]	Glutathion	0.142 M	
$[\text{Sec}^{11}, \text{Sec}^{14}, \text{Lys}^{16}]$ -grx-[10–17]	DTT	85	6.5
$[\text{Sec}^{11}, \text{Cys}^{14}, \text{Lys}^{16}]$ -grx-[10–17]	DTT	1.3	
$[\text{Sec}^{11}, \text{Cys}^{14}, \text{Lys}^{16}]$ -grx-[10–17]	$\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	15 700 M	

[a] Die Peptide wurden in der oxidierten Form in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0 und pH 8.5) bei 20 °C mit Glutathion [8], DTT oder β -Sulfanylethanol inkubiert.

tuell nicht idealen Gleichgewichtsbedingungen, wurde die Reduktion dieses Peptides auch mit β -Sulfanylethanol durchgeführt ($E_0 = -207 \text{ mV}$ bei pH 7.0^[7]). Die durch beide Experimente bestimmten Redoxpotentiale ($E = -326 \text{ mV}$ gegen DTT und -332 mV gegen β -Sulfanylethanol) stimmen unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen sehr gut überein. Die Unterschiede der Redoxpotentiale der Sec- und Cys-Peptide im Vergleich zu dem von Glutathion als dem Hauptredoxsystem der lebenden Zellen^[13] sind in Abbildung 2 dargestellt.

Das Redoxpotential des Selenocystinpeptides $[\text{Sec}^{11}, \text{Sec}^{14}, \text{Lys}^{16}]$ -grx-[10–17] ($E = -381 \text{ mV}$ bei pH 7.0 und -389 mV bei pH 8.5 und 20 °C) war zwar im Gegensatz zu früheren Spekulationen^[5] deutlich kleiner als das von DTT ($E = -323 \text{ mV}$), aber in guter Übereinstimmung mit dem von Selenocystamin ($E = -349 \text{ mV}$, errechnet aus dem gegen DTT bestimmten K_{ox} -Wert von 7.14 M^{-1} ^[3]). Im Unterschied hierzu sind die Redoxeigenschaften der Sec,Cys-Peptide ($E = -326 \text{ mV}$) denen von DTT ($E = -323 \text{ mV}$) sehr ähnlich, die damit eine deutlich höhere reduzierende Wirkung aufweisen als Glutathion ($E = -205 \text{ mV}$ ^[7]). Da der K_{ox} -Wert des Sec,Sec-Peptides erheblich höher ist als der des Sec,Cys-Peptides (Tabelle 1), ist die Bildung einer gemischten Se-S-Brücke gegenüber einer Se-Se-Brücke deutlich benachteiligt. Dieser Befund kann einen interessanten neuen Ansatz zum Design produktiver Intermediate auf dem oxidativen Faltungspfad von synthetischen Peptiden und rekombinanten Proteinen eröffnen, da die Se-Se-Verbrückung unabhängig von der Anwesenheit zusätzlicher Cysteinreste verlaufen sollte. Darüber hinaus ist bekannt, daß Alkanselenole die Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen beschleunigen können;^[3, 14] der Einbau solcher chemischer „Wegweiser“ in Proteinsequenzen könnte den oxidativen Faltungsprozess durch Nachahmung der Funktion der Protein-Disulfid-Isomerase beschleunigen.

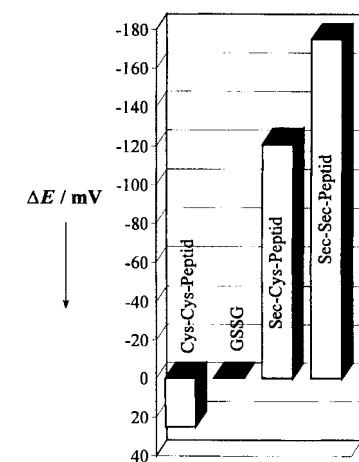


Abb. 2. Die Redoxpotentiale von $[\text{Cys}^{11}, \text{Cys}^{14}]$, $[\text{Sec}^{11}, \text{Cys}^{14}, \text{Lys}^{16}]$ - und $[\text{Sec}^{11}, \text{Sec}^{14}, \text{Lys}^{16}]$ -grx-[10–17] bei pH 7.0 und 20 °C bezogen auf Glutathion (GSSG) bei pH 7.0. Das Redoxpotential von $[\text{Cys}^{11}, \text{Cys}^{14}]$ -grx-[10–17] ($E = -180 \text{ mV}$) wurde aus dem mit Glutathion bestimmten K_{ox} -Wert [8] berechnet, wobei für Glutathion das von Szajewski und Whitesides [7] ermittelte Potential von $E_0 = -205 \text{ mV}$ eingesetzt wurde.

Eingegangen am 14. November 1996 [Z9772]

Stichworte: Peptide · Redoxreaktionen · Selen

- [1] T. C. Stadtman, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 83–100.
- [2] S. Müller, H. Senn, B. Gsell, W. Vetter, C. Baron, A. Böck, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3404–3412.
- [3] R. Singh, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6931–6933.
- [4] W. H. H. Günther, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 3931–3933.
- [5] T. Koide, H. Itoh, A. Otaka, H. Yasui, M. Kuroda, N. Esaki, K. Soda, N. Fujii, *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 502–506.
- [6] R. J. Deshaies, B. D. Koch, M. Werner-Washburne, E. A. Craig, R. Shekman, *Nature* **1988**, *332*, 800–805.
- [7] R. P. Szajewski, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2011–2026.
- [8] F. Siedler, S. Rudolph-Böhner, M. Doi, H.-J. Musiol, L. Moroder, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7488–7495.

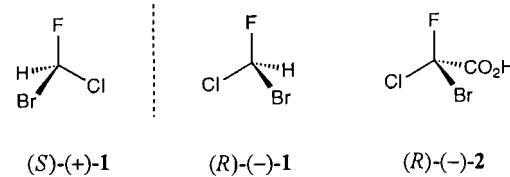
- [9] S. Rudolph-Böhner, F. Siedler, L. Moroder, *Peptides 1994* (Hrsg.: H. L. S. Maia), ESCOM, Leiden, 1995, S. 578–579.
 [10] L. Moroder, D. Besse, H.-J. Musiol, S. Rudolph-Böhner, F. Siedler, *Biopolymers (Pept. Sci.)* 1996, 40, 207–234.
 [11] D. Besse, S. Pegoraro, T. Diercks, H. Kessler, L. Moroder, *Proc. 6th Akabori Conf.* (Hrsg.: Y. Shimomishi), Protein Research Foundation, Osaka, 1996, S. 24–29.
 [12] J. Houk, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 6825–6836.
 [13] D. P. Jones, *Methods Enzymol.* 1995, 252, 3–13.
 [14] R. Singh, L. Kats, *Anal. Biochem.* 1995, 232, 86–91.

Die absolute Konfiguration von Bromchlorfluormethan aus experimentellen und mit ab-initio-Methoden berechneten Daten des optisch-aktiven Raman-Effekts**

Jeanne Costante, Lutz Hecht, Prasad L. Polavarapu,*
 André Collet* und Laurence D. Barron*

Bromchlorfluormethan **1** ist eines der einfachsten möglichen Beispiele für das Konzept des asymmetrischen Kohlenstoffatoms von Le Bel und van't Hoff und seit seiner ersten Synthese durch Swarts vor über hundert Jahren^[1] wurde wiederholt versucht, es in seine Enantiomere zu trennen und deren Drehwerte zu messen. Diese Anstrengungen gipfelten 1985 in der ersten analytischen Trennung^[2] einer geringfügig enantiomerenangereicherten Probe, die von Wilen et al.^[3] erhalten worden war, so daß eine maximale spezifische Drehung (d. h. die Drehung durch das reine Enantiomer) von $[\alpha]_D^{25} = \pm 1.6$ (in Substanz, $\rho = 1.91 \text{ kg dm}^{-3}$) geschätzt werden konnte.^[4] Inzwischen wurden über die absolute Konfiguration von **1** viele Vermutungen angestellt. Die einfache empirische Regel von Brewster,^[5] die auf den Atompolarisierbarkeiten basiert, sagt die (S)-(+)-Konfiguration voraus, wobei angenommen wird, daß die Reihenfolge der Polarisierbarkeiten $\text{H} > \text{F}$ ist.^[6] Die gleiche Voraussage wurde von Applequist unter Verwendung eines Atom-Dipol-Wechselwirkungsmodells gemacht;^[7] in diesem Modell ist jedoch die Reihenfolge der Polarisierbarkeiten umgekehrt: $\text{F} > \text{H}$. In Anbetracht seiner einfachen Struktur ist Bromchlorfluormethan lange als ideales Objekt für Untersuchungen zur schwingungsspektroskopischen optischen Aktivität (IR- und Raman-Effekt) angesehen worden, und mit semiempirischen Verfahren wurden sowohl sein Schwingungs-CD-Spektrum (vibrational circular dichroism = VCD)^[8, 9] als auch sein optisch-aktiver Raman-Effekt (Raman optical activity =

ROA)^[9–11] berechnet; aber diese Berechnungen konnten wegen des Mangels an ausreichend enantiomerenangereicherten Proben nicht experimentell bestätigt werden. Geeignete Substanzproben sind vor kurzem zugänglich geworden, und wir berichten hier aus unserer Arbeit mit dem (–)-Enantiomer über das erste experimentelle ROA-Spektrum von **1** sowie eine ab-initio-Berechnung, die es uns ermöglicht hat, auf einer fundierten Basis die absoluten Konfigurationen von **1** als (S)-(+)- und (R)-(–) zu bestimmen.



Diese Untersuchung wurde dank Arbeiten von Doyle und Vogl^[12] möglich, die berichtet hatten, daß enantiomerenangereicherte Strychninsalze der Bromchlorfluoresigsäure **2** leicht bei 120 °C in Ethylenglycol decarboxylieren und enantiomerenangereichertes **1** unter erstaunlicher Erhaltung der optischen Aktivität liefern. Die für die ROA-Messungen verwendete Probe von (–)-**1** wurde durch Decarboxylierung eines Strychninsalzes von (R)-(–)-**2** mit 51% *de* erhalten (siehe *Experimentelles*). Ihr $[\alpha]_D^{25}$ -Wert war -0.64 ± 0.03 ($c = 6.5$ in Cyclohexan), und ihr *ee*-Wert wurde $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch mit (+)-Cryptophan C als chiralem Verschiebungsreagens^[12] (Abb. 1) auf $(36 \pm 2)\%$ geschätzt. Daraus ergibt sich als extrapolierte maximale spezifische Drehung von **1** in Cyclohexan $[\alpha]_D^{25} = \pm (1.78 \pm 0.18)$, was mit dem oben genannten Wert von ± 1.6 für die reine Flüssigkeit übereinstimmt.

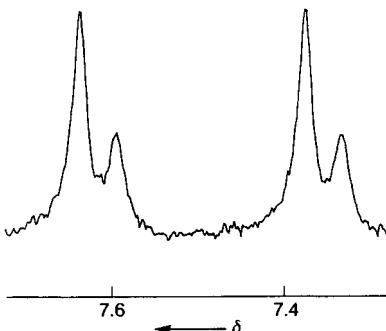


Abb. 1. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ($J_{\text{H},\text{F}} = 52 \text{ Hz}$) der Probe von (–)-**1**, die in den ROA-Experimenten verwendet wurde, in Gegenwart von (+)-Cryptophan C. Das größere Doublett (tieffeldverschoben) stammt von (–)-**1**, das kleinere von (+)-**1**.

In ROA-Spektren wird die optische Aktivität einer Schwingung als die geringe Differenz gemessen, die zwischen den Intensitäten der Raman-Strahlung chiraler Moleküle bei rechts und links circular polarisierter einfallender Laserstrahlung auftritt.^[13–16] Dieses Prinzip ist seit über zwanzig Jahren bekannt,^[17] doch seine Anwendung war zunächst durch die geringe Empfindlichkeit und die langen Meßzeiten der damals gebräuchlichen ROA-Instrumente eingeschränkt. Dank Fortschritten in der Geräteentwicklung^[18] sind ROA-Messungen jetzt jedoch schnell und routinemäßig an einer Vielzahl von Proben möglich. Parallel dazu wurden ab-initio-Verfahren entwickelt, mit denen man das Vorzeichen und die Größe der ROA-

[*] Prof. Dr. L. D. Barron, Dr. L. Hecht
 Chemistry Department, The University, Glasgow G12 8QQ (Großbritannien)
 Telefax: Int. + 141/330-4888
 E-mail: laurence@chem.gla.ac.uk

Prof. Dr. P. L. Polavarapu
 Department of Chemistry, Vanderbilt University
 Nashville, TN 37235 (USA)
 Telefax: Int. + 615/322-4936
 E-mail: polavapl@ctrvax.vanderbilt.edu

Prof. Dr. A. Collet, Dr. J. Costante
 École Normale Supérieure de Lyon, Stéreochemie et Interactions Moléculaires
 (UMR CNRS 117)
 F-69364 Lyon Cedex 07 (Frankreich)
 Telefax: Int. + 472728483
 E-mail: andre.collet@stim.ens-lyon.fr

[**] Wir danken dem BBSRC und der NATO (Nr. 950763) für finanzielle Unterstützung und dem EPSRC für ein Forschungsstipendium für L. D. B., außerdem Dr. C. S. Ewig für Diskussionen über die für Brom geeigneten Basissätze und für das Überlassen der Basissätze, die in dieser Arbeit verwendet wurden, und dem Pittsburgh Supercomputer Center für Rechenzeit.