

Große Circulardichroismus-Elliptizitäten für Polypeptide mit N-terminal induzierter Helixkonformation sind nicht in Einklang mit den derzeit akzeptierten Helizitätsalgorithmen**

Peter Wallimann, Robert J. Kennedy und Daniel S. Kemp*

Die Stabilität der Konformation von Polypeptiden lässt sich nur im Falle von Helices aus einer leicht bestimmbar physikalischen Größe berechnen: Wenn ein Polypeptid ein helicale Circulardichroismus(CD)-Spektrum aufweist (intensives positives Maximum bei etwa 190 nm, negative Minima bei 208 und 222 nm), wird im allgemeinen die Gleichung (1) verwendet, um zwischen der durchschnittlichen relativen Helizität^[1] (FH) und der experimentellen molaren Elliptizität für mittlere Restezahl ($[\theta]_{222}$) eine Beziehung herzustellen.^[2a, c] Die Grenzelliptizität $[\theta_{H\infty}]_{222}$ der Gleichung (1) entspricht einem vollständig helicalen Peptid unendlicher Länge, und der Ausdruck $(1 - x/N)$ mit $N = \text{Peptidlänge}; 2.4 < x < 4.5$ liefert die Korrektur für die endliche Länge.^[3] Auf der Grundlage von Untersuchungen von Polypeptiden mit N-terminal induzierter Helixkonformation, die mehr als zwölf Aminosäurereste enthalten, zeigen wir hier, daß die Literaturwerte für $[\theta_{H\infty}]_{222}$ und deren Abhängigkeit von der Länge zu niedrig geschätzt sind.

$$\text{FH} = \frac{[\theta]_{222}}{[\theta_{H\infty}]_{222} \left(1 - \frac{x}{N}\right)} \quad (1)$$

$$[\theta_H]_{222} = (-44000 + 250T) \left(1 - \frac{2.5}{N}\right) = \quad (2)$$

100 % Helizität bei einer Länge N

Bestimmte alaninreiche Peptide, die Lysin oder Arginin enthalten, erreichen in Wasser bei niedriger Temperatur FH-Werte von nahezu 0.7 bis 0.8,^[2b] jedoch erwies sich noch kein Peptid eindeutig als hundertprozentig helical. Die angeführten Werte für $[\theta_{H\infty}]_{222}$ von 37000 bis 44000 $^{\circ}\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$ sind normalerweise als Grenzwerte einer Reihe von temperaturabhängigen oder additivabhängigen CD-Spektren extrapoliert.^[2c, 4]

Die Elliptizitätswerte von Peptiden, die mit einem effektiven Helixinitiator, z. B. dem N-terminalen Templat AcHel, amidverknüpft sind,^[5] sollten eine bessere Näherung für $[\theta_{H\infty}]_{222}$ ergeben. Abbildung 1 zeigt helicale CD-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen für das N-Templat-mo-

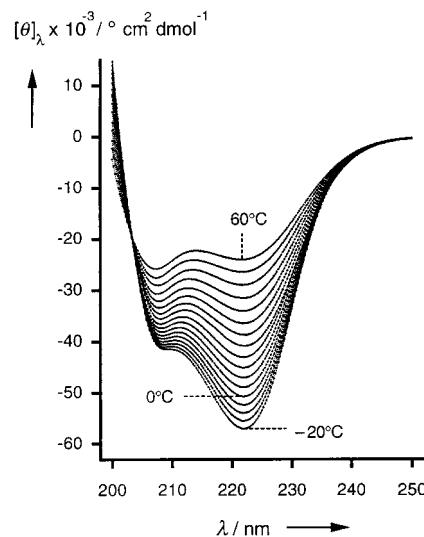


Abbildung 1. Überlagerung von 17 CD-Spektren von AcHel-(Ala₄Lys)₄-Ala₂-NH₂, die in 5-°C-Intervallen zwischen -20 und 60°C in Wasser mit 16 Mol-% Ethylenglycol (pH 1, 0.2 mol L⁻¹ NaClO₄) gemessen wurden. Peptidkonzentration: 45 μmol L⁻¹.

difizierte, 22 Reste enthaltende Peptid AcHel-(Ala₄Lys)₄-Ala₂-NH₂ **1** – in Wasser und in Gegenwart von 16 Mol-% Ethylenglycol, was CD-Messungen bei Temperaturen unter 0°C ermöglicht. Der Wert von $[\theta]_{222}$ nimmt bei Abnahme der Temperatur drastisch zu, konvergiert jedoch nicht zu einem Grenzwert. Bei der gängigen Temperatur von 2°C beträgt $[\theta]_{222}$ für **1** 50 900 $^{\circ}\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$, was dem 1.32fachen des größten veröffentlichten temperatur- und längenkorrigierten Werts von $[\theta_H]_{222}$ [Gl. (2)]^[4b, c] entspricht. Ähnliche Werte und Temperaturabhängigkeiten für **1** wurden bei pH 1 in wäßriger NaCl-Lösung (5 mol L⁻¹) und in wäßrigem 2,2,2-Trifluorethanol bei pH < 2 beobachtet.

Sind die CD-Eigenschaften von **1** bei niedriger Temperatur ungewöhnlich? In Abbildung 2 sind bei 2°C in Wasser gemessene Werte von $[\theta]_{222}$ für die N-Templat-modifizierten Peptide AcHel-(Ala₄Lys)_nAla₂-NH₂ ($n = 1$ bis 5) und für

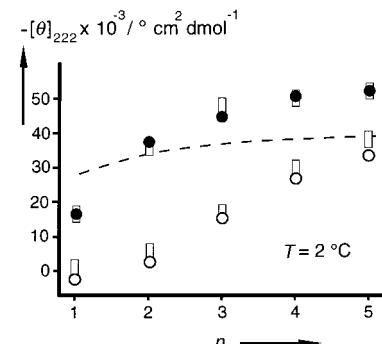


Abbildung 2. Auswirkung der Oligomerenlänge n auf den $[\theta]_{222}$ -Wert für N-Templat-modifizierte AcHel-(Ala₄Lys)_nAla₂-NH₂ (schwarze Kreise) und N-protonierte H₂⁺(Ala₄Lys)_nAla₂-NH₂ (leere Kreise). 2°C, pH 1, 0.2 mol L⁻¹ NaClO₄. Die gestrichelte Linie zeigt die berechnete Längenabhängigkeit von $[\theta_H]_{222}$ gemäß Gleichung (2). Für die templatgesteuerte Reihe mit $n > 1$ überschreiten die experimentellen Werte diese vorhergesagte Grenze. Die leeren Rechtecke geben die aus Gleichung (3) berechneten Werte von $[\theta]_{222}$ entsprechend der Beschreibung im Text und in den Hintergrundinformationen an. Die experimentellen Werte von $[\theta]_{222}$ sind bezüglich des Beitrags von AcHel (weniger als 1 % für $n > 2$) korrigiert.

[*] Prof. D. S. Kemp, Dr. P. Wallimann, R. J. Kennedy

Department of Chemistry, Rm. 18-582

Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139 (USA)

Fax: (+1) 617-258-7500

E-mail: kemp@ucockatoo.mit.edu

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (GM 13453), der National Science Foundation (9121702-CHE) und dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Stipendium für P.W.) unterstützt. Wir danken Prof. Klaus Biemann für die Aufnahme der MALDI-Massenspektren und Prof. Peter Kim für die Erlaubnis zur Nutzung der Ultrazentrifuge.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

die analogen N-protonierten Peptide $H_2^+(Ala_4Lys)_nAla_2-NH_2$ gezeigt. Es stehen auch Daten für die Reihe AcHel-(Ala₄Lys)_nAla₂-NH₂ ($n=0$ bis 6) und für die Konjugate AcHel-Ala₄Glu(Ala₄Lys)₂Ala₂-NH₂ sowie AcHel-(Ala₄Lys)₂Ala₇-X-NH₂ (X=Lys oder Arg) zur Verfügung. Bei diesen zehn partiell helicalen AcHel-Peptiden mit $16 < N < 22$ liegen die Werte für $-[\theta]_{222}$ bei 2 °C in Wasser bei pH 1 über den aus der Gleichung (2) vorhergesagten Werten von $-[\theta_H]_{222}$ für hundertprozentig helicale Peptide, wobei das mittlere Verhältnis $[\theta]_{222}/[\theta_H]_{222}$ 1.14 (± 0.04) beträgt.

Wäre es möglich, daß das Vorhandensein des Templaats die CD-Spektren der Konjugate deutlich im Voraus beeinflußt? Der Beitrag des CD-Chromophors des Templaats auf $-[\theta]_{222}$ von stark helicalen Peptiden ist gering.^[5b] Von größerer Bedeutung ist, daß die bei niedrigen Temperaturen gemessenen CD-Spektren von Peptiden, deren Konformation nicht templatinduziert ist, und die bei höheren Temperaturen gemessenen entsprechenden Spektren ihrer AcHel-Konjugate übereinandergelegt werden können (Abbildung 3). Das Templat bewirkt also nur eine Stabilisierung der Peptidhelix, während alle Einzelheiten des CD-Spektrums erhalten bleiben.

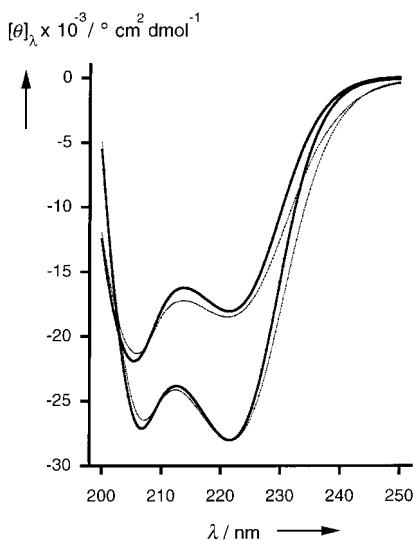


Abbildung 3. Vergleich der CD-Kurvenformen ($0.2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaClO}_4$, pH 1). Dünne Kurven: AcHel-(Ala₄Lys)₄Ala₂-NH₂ bei 40 °C (unteres Spektrum) und 55 °C (oberes Spektrum). Dicke Kurven: $H_2^+(Ala_4Lys)_4Ala_2-NH_2$ bei 0 °C (unteres Spektrum) und 20 °C (oberes Spektrum).

Die Werte von $[\theta]_{222}$ für templatgesteuerte und nicht templatgesteuerte Peptide in Abbildung 2 lassen Trends erkennen, die in Einklang sind mit FH-Werten, die nach der Lifson-Roig(L-R)-Gleichung berechnet wurden. In die L-R-Gleichung gehen die Peptidlänge N , eine Initiationskonstante v und die Neigung von Aminosäuren zur Helixbildung w als Variable ein.^[6] Die L-R-Rechnung behandelt ein helicale Peptid als eine Vielzahl nichthelicaler, vollständig helicaler und partiell helicaler Konformationen und ordnet jeder helicalen Konformation eine relative Häufigkeit in Form eines Molenbruchs χ_H zu. Die relative Helizität FH einer einzelnen helicalen Konformation beträgt k/N (k =Länge des helicalen Bereichs), so daß jede Konformation zur Gesamt-FH mit $\chi_H(k/N)$ beiträgt. Für die kurzen ($n=1$ oder 2) nicht

templatgesteuerten Peptide, die unter den Abbildung 2 entsprechenden Bedingungen untersucht wurden, sind die am häufigsten auftretenden Konformationen nichthelical, für $n=3-5$ dominieren jedoch die helicalen Konformationen. Dieser Unterschied führt zu einer drastischen Zunahme der FH mit der Länge, die sich in der sigmoiden Form der $-[\theta]_{222}$ -Kurve äußert. Die ganz unterschiedliche monotone Form der Kurve für die Reihe der templatgesteuerten Peptide spiegelt die Rolle des Templaats als effizienter Helixinitiator wider. Bei allen N-Templat-modifizierten Peptiden dominieren die helicalen Konformationen.

Das Templat erhöht ferner selektiv den χ_H -Wert von Konformationen mit langen helicalen Bereichen. Dieser Effekt erklärt ein zweites Merkmal der in Abbildung 2 gezeigten Daten. Für $n=4$ oder 5 weisen die templatgesteuerten Peptide viel größere Werte von $-[\theta]_{222}$ auf. Da k/N für diese Konformationen nahe bei 1 liegt, tragen sie maximal zur relativen Helizität und zu $-[\theta]_{222}$ bei. Dagegen wird die Helixvielfalt für nicht templatgesteuerte Proteine von vielen Konformationen mit kurzen helicalen Bereichen dominiert. Diese weisen kleinere k/N -Werte auf und tragen ineffizient zur FH bei.

Die L-R-Gleichung gibt somit qualitativ ein Modell für die in Abbildung 2 gezeigten Daten an. Für ein quantitatives Modell ist eine geänderte Version von Gleichung (2) notwendig. Die gestrichelte Linie in Abbildung 2 gibt die aus der Gleichung (2) berechneten Werte von $-[\theta_H]_{222}$ an, wobei die Gleichung den für ein hypothetisches Peptid mit einer FH von 1.0 erwarteten experimentellen Wert von $-[\theta]_{222}$ vorhersagt. Die berechneten FH-Werte für die templatgesteuerten Peptide mit $n=3-5$ fallen in den Bereich von 0.81–0.85. Nach Gleichung (2) werden daher die experimentellen Werte von $-[\theta]_{222}$ weitaus zu niedrig geschätzt. Dividiert man $-[\theta]_{222}$ für $n=5$ durch die FH, so erhält man 61 000 als Näherungswert für $-[\theta_H]_{222}$ in diesem Helixlängenbereich ($k > 20$). Der entsprechende Wert für das erste templatgesteuerte Peptid ($n=1$, $k \leq 7$) ist 30 000. Die neu festgelegten Werte für $-[\theta_H]_{222}$ müssen innerhalb des Peptidgrößenbereichs von 7 bis 20 Resten klar verdoppelt werden, und verbesserte Modelle zur Berechnung von $-[\theta]_{222}$ müssen Konformationen, die große oder kleine helicale Bereiche aufweisen, ganz unterschiedliche Werte von $[\theta_H]_{222}$ zuweisen.

Ein einfaches Zwei-Zustände-Modell paßt zu den Daten von Abbildung 2. FH läßt sich in Form von $FH_{\text{groß}} + FH_{\text{klein}}$ angeben, wobei jedem FH-Term unterschiedliche Werte von $[\theta_H]_{222}$ zugeordnet werden können [Gl. (3)].

$$[\theta_H]_{222,\text{berechnet}} = [\theta_H]_{222,\text{klein}} FH_{\text{klein}} + [\theta_H]_{222,\text{groß}} FH_{\text{groß}} \quad (3)$$

Wir legen fest, daß FH_{klein} Konformationen mit $k \leq 11$ helicalen Resten umfaßt und setzen $[\theta_H]_{222,\text{klein}}$ gleich Gleichung (2) mit $N=11$, die für $[\theta]_{222}$ in diesem Größenbereich eine gute Näherung ergibt.^[7] Wir legen fest, daß $FH_{\text{groß}}$ Konformationen mit $k > 11$ umfaßt und setzen $[\theta_H]_{222,\text{groß}}$ gleich $-61\,000$. Die Werte für den Parameter für AcHel, den Initiationsparameter und die Neigung zur Helixbildung von Ala und Lys wurden bereits beschrieben.^[2, 5c] Entsprechend Abbildung 2 ist mit diesen Parametern und mit Gleichung (3) eine hervorragende Näherung für den experi-

mentellen Wert von $[\theta]_{222}$ für die Reihe AcHel-(Ala₄Lys)_n-Ala₂-NH₂ möglich. Für den Wert von $[\theta]_{222}$ für die nicht templatgesteuerten Peptide (Abbildung 2) paßt ebenfalls Gleichung (3), vorausgesetzt, die durchschnittliche Neigung zur Helixbildung wird um 9% verringert, um den helixdestabilisierenden Effekt der N-terminalen positiven Ladung zu kompensieren. Diese unter Verwendung eines einfachen Zwei-Zustände-Modells für einen begrenzten Datensatz erzielte Übereinstimmung ist ein erster Schritt in Richtung auf eine stärkere Beziehung zwischen $[\theta]_{222}$ und FH. Umfassendere Daten, bei denen die Abhängigkeit von der Länge untersucht wird, sind zur Verfeinerung des Modells notwendig.

Ist das Minimum bei 222 nm für die Korrelation von $[\theta]$ mit FH günstig? Obwohl allgemein verwendet, experimentell bequem und gegenüber ebenfalls vorhandenen nichthelicalen Konformationen relativ unempfindlich, ist $[\theta]_{222}$ möglicherweise weniger zuverlässig als $[\theta]_{208}$ – dieser Elliptizitätswert wird in der älteren Literatur angegeben.^[8] Die beiden kurzweligen Extrema des helicalen CD bei 195 nm und 208 nm entsprechen vertikalen und parallelen elektronischen π - π^* -Übergängen und wurden theoretisch zufriedenstellend erklärt, nicht jedoch der n- π^* -Übergang bei 222 nm.^[9] Des Weiteren wurden für das Verhältnis von $[\theta]_{208}$ zu $[\theta]_{222}$ große Veränderungen bei helicalen Peptiden beschrieben, wie dies aus den in Abbildung 1 gezeigten Daten ersichtlich ist. Dieses Verhältnis ließ sich zwar mit den relativen Anteilen von α - und 3_{10} -Helixkonformationen innerhalb der Helixvielfalt korrelieren, doch bleibt die Zuordnung der CD-Grenzspektren für reine α - und 3_{10} -Zustände kontrovers.^[10] Es ist nicht klar, welcher $[\theta]$ -Wert die bessere Korrelation mit dem Gesamt-FH-Wert, FH(α) + FH(3_{10}), ergibt.

Zwei Fragen bleiben bei unserer Untersuchung offen. Die starke Längenabhängigkeit von $-[\theta]_{H222}$ im Bereich von 7 bis 20 Resten wurde nach einem unabhängigen Verfahren aufgezeigt,^[11] doch ist die Ursache hierfür unbekannt. Das hier vorgestellte Zwei-Zustände-Modell scheint nicht mit den für Peptide mit $N > 30$ beschriebenen experimentellen Werten von $[\theta]_{222}$ übereinzustimmen. Zur Klärung dieser Sachverhalte werden derzeit Experimente durchgeführt. Deren Ergebnisse sollten sich jedoch nicht auf unsere wichtigste Schlussfolgerung auswirken. Für die Klasse alaninreicher, lysinhaltiger Peptide mit $15 > N > 27$ geben die Literaturgleichungen, die FH zu den experimentellen Werten von $[\theta]_{222}$ in Bezug setzen, für $[\theta]_{H222}$ zu niedrige Schätzwerte^[12] und für die entsprechenden FH-Werte um 25–50% zu hohe Schätzwerte an.

Experimentelles

Die Peptide wurden wie zuvor beschrieben hergestellt,^[5d] durch wiederholte Umkehrphasen-HPLC gereinigt und durch MALDI-MS (matrixgestützte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie) und Aminosäurenanalyse analysiert. Die Reinheit aller Verbindungen wird auf >95% geschätzt. Die Lösungen wurden zum Vergleich mit NMR-Messungen auf pH 1–2 gehalten, und es wurden zum Vergleich mit Literaturmessungen NaClO₄-Puffer verwendet. Die CD-Spektren wurden mit einem thermostabilisierten CD-Spektrometer (Aviv 62DS), das nach Literaturverfahren kalibriert worden war,^[13] aufgenommen. Die Konzentrationen der CD-Lösungen wurden mit einer Fehlerrgrenze von 5% sowohl durch einen quantitativen Ninhydrinrest^[7b] als auch durch Aminosäurenanalyse^[14] bestimmt. Die Lösungen von AcHel-(Ala₄Lys)Ala₂-NH₂ ($n = 4, 5$) und

ausgewählten nicht templatgesteuerten Analoga waren CD-Verdünnungsstudien und analytischen Ultrazentrifugationsuntersuchungen zufolge monomer.

Eingegangen am 25. August 1998,
ergänzte Fassung am 1. Februar 1999 [Z 12332]
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1290–1292

Stichwörter: Circulardichroismus • Helicale Strukturen • Peptide

- [1] Die relative Helizität FH ist der Bruchteil der α -Kohlenstoffatome des inneren Rückgrats eines Peptids, die zu Helices gehören. Die inneren α -Kohlenstoffatome sind von Amidgruppenpaaren umgeben.
- [2] a) A. Chakrabarty, T. Kortemme, R. L. Baldwin, *Protein Science* **1994**, *3*, 843–852; b) S. Marqusee, V. H. Robbins, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5286–5290; c) S. Padmanabhan, S. Marqusee, T. Ridgeway, T. M. Laue, R. L. Baldwin, *Nature* **1990**, *344*, 268–270.
- [3] P. J. Gans, P. C. Lyu, M. C. Manning, R. W. Woody, N. R. Kallenbach, *Biopolymers* **1991**, *31*, 1605–1614.
- [4] a) J. M. Scholtz, D. Barrick, E. J. York, J. M. Stewart, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 185–189, zit. Lit.; b) P. Luo, R. L. Baldwin, *Biochemistry* **1997**, *36*, 8413–8421; c) J. M. Scholtz, H. Qian, E. J. York, J. M. Stewart, R. L. Baldwin, *Biopolymers* **1991**, *31*, 1463–1470.
- [5] AcHel-OH = (2S,5S,8S,11S)-1-Acetyl-1,4-diaza-3-oxo-5-carboxy-10-thiatricyclo[2.8.1.0^{4,8}]tridecan. a) D. S. Kemp, S. L. Oslick, T. J. Allen, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4249–4255; b) D. S. Kemp, T. J. Allen, S. L. Oslick, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6641–6657; c) P. Renold, K.-Y. Tsang, L. S. Shimizu, D. S. Kemp, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12234–12235; d) K. Groebke, P. Renold, K.-Y. Tsang, T. J. Allen, K. F. McClure, D. S. Kemp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4025–4029.
- [6] a) S. Lifson, A. Roig, *J. Chem. Phys.* **1961**, *34*, 1963–1974; b) H. Qian, J. A. Schellman, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 3987–3994.
- [7] a) D. S. Kemp, T. J. Allen, S. L. Oslick, J. G. Boyd, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4240–4248; b) S. L. Oslick, Dissertation, Massachusetts Institute of Technology, **1996**. c) Für die vorliegenden Daten ergibt $10 < N < 12$ ähnliche Näherungen.
- [8] N. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108–4116.
- [9] M. C. Manning, R. W. Woody, *Biopolymers* **1991**, *31*, 569–586.
- [10] a) C. Toniolo, A. Polese, F. Formaggio, M. Crisma, J. Kamphuis, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2744–2745; b) N. H. Andersen, Z. Liu, K. S. Prickett, *FEBS Lett.* **1996**, *399*, 47–52; c) T. S. Sudha, E. K. S. Vijayakumar, P. Balaram, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1983**, *22*, 464–468.
- [11] L. S. Shimizu, Dissertation, Massachusetts Institute of Technology, **1997**.
- [12] Für weitere Hinweise siehe: N. D. Lazo, D. T. Downing, *Biochemistry* **1997**, *36*, 2559–2565.
- [13] G. C. Chen, J. T. Yang, *Anal. Lett.* **1977**, *10*, 1195–1207.
- [14] Biopolymers Lab, MIT, USA.