

Stabilisierung kurzer, ungeladener Peptidhelices durch chaotrop Anionen – Neues zum Perchlorat-Effekt**

Wolfgang Maison, Robert J. Kennedy und Daniel S. Kemp*

Bei einer Untersuchung der pH-abhängigen Helizität kurzkettiger Polyalaninsequenzen, die am N-Terminus ein helixinitierendes Templat der Ac-Hel-Familie^[1] tragen, haben wir einen bemerkenswerten stabilisierenden Effekt von gering hydratisierten („chaotropen“) Anionen festgestellt.^[2] Diese binden bekanntermaßen sowohl an pH-denaturierte Proteine^[3] als auch an polykationische Peptide^[4] und stabilisieren dabei durch elektrostatische Abschirmung partiell gefaltete Konformationen wie Helices. Im Folgenden beschreiben wir erstmalig eine bemerkenswerte anioninduzierte Stabilisierung der Helixkonformation bei kurzkettigen, N-überkappten Polyalaninsequenzen, die keine geladenen Gruppen enthalten. Neben der helixinduzierenden N-Kappe Hel enthalten diese Polyalaninsequenzen vor kurzem von uns vorgestellte N- und C-Kappen, die löslichkeitsvermittelnd wirken und den Polyalaninkern von möglichen, seine Helizität beeinflussenden Effekten der K₄-Region sowie der Reportergruppe Trp (W) isolieren. Die Kappe tLInp₂K₄W beispielsweise enthält den Spacer tLInp₂, der aus der α -Aminosäure *tert*-Leucin (tL, *tert*-Butylglycin) und der γ -Aminosäure Isonipectin (Inp, 4-Carboxypiperidin) aufgebaut ist. Wir konnten bereits zeigen,^[5] dass Regionen, die durch tLInp₂ voneinander getrennt sind, unabhängig voneinander zum Circular dichroismus(CD)-Spektrum des Peptides beitragen und dass unter den hier gewählten Bedingungen die gesamte Region tLInp₂K₄W nur unwesentlich zur CD-Ellipitizität $[\theta]$ bei 222 nm beiträgt, die im Folgenden als Maß für die Helizität verwendet wird.

Wir nehmen die 1:1-Bindung eines chaotropen Anions mit einer Peptidhelix an, um die beobachteten Effekte, wie die in Abbildung 1 dargestellte Abhängigkeit von $[\theta]_{222}$ von der Perchlorsäurekonzentration für WK₄Inp₂LGHel-A₈-NH₂ **3**, zu erklären. Eine säure- oder aggregationsbedingte Helixstabilisierung konnte hierbei durch Titrationen des Peptides **3** mit Salzsäure bzw. durch Verdünnungsreihen bis zu 100facher Verdünnung ausgeschlossen werden. In beiden Fällen ist keine signifikante Änderung von $[\theta]_{222}$ festzustellen (siehe Hintergrundinformationen).

Mit Natriumperchlorat statt Perchlorsäure wurde eine ähnliche Helixstabilisierung festgestellt (Abbildung 2); andere übliche Salze haben diesen Effekt nicht. Ein möglicher

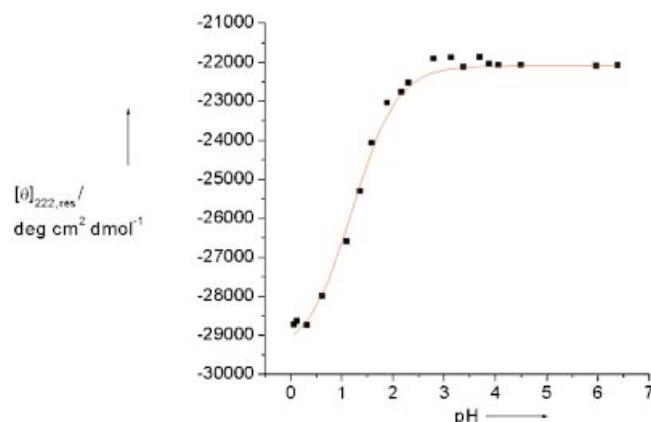


Abbildung 1. CD-spektroskopische Untersuchung der Perchlorsäuretitration des Peptides **3** bei 2°C. Die Quadrate geben die experimentellen Daten an, und die rote Linie stellt die beste, nach der Methode der kleinsten Quadrate ermittelte Anpassung an diese Daten dar. $[\theta]_{222,\text{res}}$ bezeichnet die molare CD-Ellipitizität bei 222 nm pro Aminosäurebaustein der Helix.

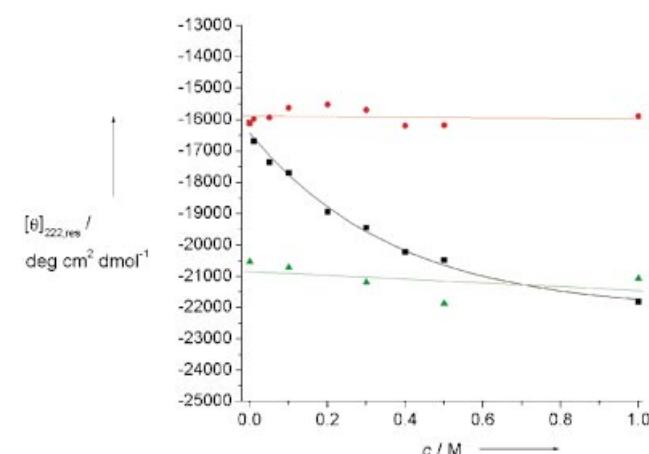


Abbildung 2. CD-spektroskopische Untersuchungen der Salztitrationen der Peptide **5** und **9** bei 2°C. ■ NaClO₄ (Nr. 5a in Tabelle 1), ● NaCl (Nr. 5c), ▲ NaClO₄ (Nr. 9).

Einfluss unspezifischer Salzeffekte auf $[\theta]_{222}$, die nicht mit der Helizität des Peptides in Zusammenhang stehen, wurde durch ¹³C-NMR-spektroskopische Untersuchungen ¹³C-carbonyl-markierter Peptide^[6] ausgeschlossen. Die ermittelte Veränderung der chemischen Verschiebungen für die Carbonylkohlenstoffatome geht einher mit der Änderung der CD-Ellipitizitäten, ebenso die Veränderung des s-trans/s-cis-Verhältnisses der Helixreporterfunktion unserer N-terminalen Kappe Ac-Hel^[7] (siehe Hintergrundinformationen). Drei voneinander unabhängige Methoden bestätigen also den starken helixstabilisierenden Effekt des Perchloration bei den untersuchten Polyalaninsequenzen.

Tabelle 1 fasst die Ergebnisse der Titrationen unterschiedlicher Peptidsequenzen zusammen. Diese bestehen alle aus einem Polyalaninkern und einer Ac-Hel- oder X-Gly-Hel-Gruppe an dessen N-Terminus. Diese beiden Kappen stabilisieren die Helix etwa gleich stark. Eine Polylysineinheit sorgt für die nötige Löslichkeit in Wasser, und eine Tryptophaneinheit dient als UV-Reportergruppe. Der tLInp₂-Spacer zwischen dem Polyalaninkern und dem dem Löslichkeitsver-

[*] Prof. D. S. Kemp, Dr. W. Maison, R. J. Kennedy
Department of Chemistry, Room 18-582
Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, MA 02139 (USA)
Fax: (+1)617-258-7500
E-mail: kemp@mit.edu

[**] Diese Arbeit wurde von den NIH (GM 13453), von der NSF (9121702-CHE), von Pfizer Research und durch ein Feodor-Lynen-Stipendium der Alexander-von-Humboldt-Stiftung an W.M. unterstützt.

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

Tabelle 1. Ergebnisse der CD-spektroskopischen Analyse von Salz- und Säuretitrationen unterschiedlicher Polyalaninsequenzen bei 2°C.

Nr.	Sequenz ^[a]	Additiv	$\Delta[\theta]_{222,\text{res}}^{[b]}$ [%]	$c_{1/2}^{[c]}$ [M]
1	WK ₄ Inp ₂ LGHelA ₄ -NH ₂	HClO ₄	84	0.13 ± 0.01
2	WK ₄ Inp ₂ LGHelA ₆ -NH ₂	HClO ₄	78	0.09 ± 0.01
3	WK ₄ Inp ₂ LGHelA ₈ -NH ₂	HClO ₄	30	0.06 ± 0.01
4	WK ₄ Inp ₂ LGHelA ₁₂ -NH ₂	HClO ₄	9	0.07 ± 0.01
5a	AcHelA ₈ tLInp ₂ K ₄ W-NH ₂	NaClO ₄	35	0.24 ± 0.04
5b	AcHelA ₈ tLInp ₂ K ₄ W-NH ₂	NaBF ₄	22	— ^[d]
5c	AcHelA ₈ tLInp ₂ K ₄ W-NH ₂	NaCl	—	—
5d	AcHelA ₈ tLInp ₂ K ₄ W-NH ₂	NaHSO ₄	—	—
5e	AcHelA ₈ tLInp ₂ K ₄ W-NH ₂	NaH ₂ PO ₄	—	—
5f	AcHelA ₈ tLInp ₂ K ₄ W-NH ₂	NaPF ₆	39	— ^[d]
6	AcHelA ₄ KA ₃ tLInp ₂ K ₄ W-NH ₂	NaClO ₄	49	0.20 ± 0.01
7	AcHelA ₄ KtLInp ₂ K ₄ W-NH ₂	NaClO ₄	23	0.21 ± 0.02
8	AcHelA ₇ βtLInp ₂ K ₄ W-NH ₂	NaClO ₄	29	0.12 ± 0.01
9	Ac ^β DhelA ₇ βtLInp ₂ K ₄ W-NH ₂	NaClO ₄	—	—

[a] tL = *tert*-Leucin, Inp = 4-Carboxypiperidin, β = β-Aminoalaniin, Ac^βD = N-Acetyl-β-aspartat. [b] Differenz der gemessenen $[\theta]_{222,\text{min}}$ und $[\theta]_{222,\text{max}}$ -Werte für Salztitrationen. [c] Salzkonzentration bei halber Sättigung der Bindungsstelle des Peptids, berechnet nach der Methode der kleinsten Quadrate aus den experimentellen CD-Elliptizitäten ($1/c_{1/2} = K$). [d] Die Daten sind nicht mit einem 1:1-Bindungsmodell in Einklang zu bringen.

mittler und der Reportergruppe verhindert, dass diese Gruppen die Helizität des Alaninkerns beeinflussen.^[5] Wie an den Beispielen 3 und 5a in Tabelle 1 zu erkennen ist, hat die Position des Löslichkeitsvermittlers qualitativ keinen Einfluss auf die Abhängigkeit der CD-Elliptizität von der Perchlorationkonzentration. Es bleibt anzumerken, dass die CD-Spektren der Peptide **1–9** bei hohen Salzkonzentrationen alle Merkmale eines klassischen Spektrums für eine helicale Peptid, d.h. Minima bei 208 und 222 nm sowie ein Maximum bei kleinen Wellenlängen, aufweisen (siehe Hintergrundinformationen).

Die Kurve in Abbildung 1 wurde unter der Annahme einer stöchiometrischen 1:1-Bindung zwischen Peptid und Anion berechnet; die Analyse liefert $[\theta]_{222,\text{max}}$, den Grenzwert bei hoher Perchlorationkonzentration, und die Bindungskonstante K . Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, entspricht ein mittlerer Wert für K der Halbsättigung der Peptidbindungsstelle bei einer Perchlorationkonzentration von 0.1–0.2 M. Der stabilisierende Effekt des Anions ist für kurzkettige Peptide mit niedrigen Werten für $-[\theta]_{222}$ in Wasser am größten. Für die Tetraalaninsequenz **1** beispielsweise verdoppelt sich der Wert für $-[\theta]_{222}$ nahezu bei hohen Perchlorationkonzentrationen, während für die Dodecaalaninsequenz **4** nur ein Anstieg um 9% zu verzeichnen ist.

Die Stabilisierung helicaler Strukturen durch Perchloration wurde bis jetzt nur für wenige, meist polykationische Peptide und Proteine beschrieben.^[8] So weisen bestimmte denaturierte Proteine, die bei niedrigen pH-Werten Molten-globule-Strukturen bilden, in Gegenwart chaotroper Anionen wie Perchloration eine erhöhte Helizität auf, wie Goto, Takahashi und Fink anhand von β-Lactamase, Cytochrom c und Apomyoglobin feststellten.^[9] Goto und Aimoto synthetisierten ein polykationisches Peptid, das sich zu einer Doppelhelix mit einem vom Solvens abgeschirmten hydrophoben Kern faltet.^[10] In all diesen Beispielen wird die Sekundärstruktur bei der Titration mit bestimmten Anionen erheblich verändert,

und es entstehen in Gegenwart unterschiedlichster chaotroper Anionen in geringer Konzentration kompakte, gefaltete, hochgradig helicale Konformere. Die komplexen Konformationsänderungen dieser positiv geladenen Proteine treten bereits bei niedrigeren Konzentrationen der chaotropen Anionen auf als die in Tabelle 1 aufgeführten. Diese außergewöhnliche Empfindlichkeit der polykationischen Proteine und Peptide gegenüber chaotropen Anionen spiegelt wahrscheinlich ihre Möglichkeit wider, hydrophob stabilisierte kompakte Strukturen zu bilden, nachdem sich salzinduziert die Helices gebildet haben. Unsere ungeladenen Polyalaninsequenzen gehen dagegen nur einen einzigen, einfachen Konformationswechsel ein und bilden hydratisierte Helices.

Die von uns gewählte CD-spektroskopische Analyse zur Messung der Helizität beschränkt die Wahl der Anionen auf solche, die keine UV-Absorption im Bereich 195–220 nm aufweisen, und schließt daher die effizientesten der von Goto et al. untersuchten chaotropen Anionen aus. Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, hängt bei der Titration unserer Modellpeptide mit Anionen, die ein normales Hydratationsvolumen aufweisen, wie Chlorid oder Sulfat, $-[\theta]_{222}$ nur unwesentlich von der Salzkonzentration ab. Bei der Titration mit den chaotropen Anionen BF₄⁻, PF₆⁻ und ClO₄⁻ steigt dagegen $-[\theta]_{222}$ deutlich an, was den Schluss nahelegt, dass diese Anionen an das Peptid binden und so dessen helicale Struktur stabilisieren. Unsere Befunde unterstreichen die Schwierigkeiten bei der Durchführung von CD-Untersuchungen von Polypeptiden in Gegenwart von Salzen bei niedrigen pH-Werten in Wasser, denn gegenwärtig stehen hierfür keine UV-transparenten Anionen zur Verfügung.

Auf welche Weise beeinflussen nun chaotrope Anionen die Helizität unserer ungeladenen Polyalaninsequenzen, und an welcher Stelle des Peptid wird das Perchloration gebunden? Die CD-spektroskopische Untersuchung des Peptids **9**, das eine negativ geladene Kappe am N-Terminus trägt, gibt erste Antworten auf diese Fragen. Die Zugabe von Perchloration zu **9** hat keinen merklichen Einfluss auf die CD-Elliptizität (Abbildung 2). Helixkonformationen werden durch positive Ladungen am C-Terminus und negative Ladungen am N-Terminus stabilisiert. Durch Modellierung unserer Peptide ergab sich eine mögliche natürliche Bindungsstelle für chaotrope Anionen in einer hydrophoben Tasche der Hel-Funktion in der Nähe der NH-Gruppe der ersten Aminosäure der Peptidsequenz. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass den Titrationsversuchen zufolge von den untersuchten Anionen nur das Perchloration einen 1:1-Komplex bildet. Nicht nur die chaotrope Natur (das geringe Hydratationsvolumen), sondern auch die Größe des Anions sind also für eine effiziente Bindung an das Peptid von Bedeutung.

Die Kristallstrukturuntersuchungen einiger globulärer Proteine, in denen Anionen an den N-Terminus helicaler Segmente gebunden sind, stützen unsere Hypothese.^[11] Wie wir gezeigt haben, können Anionen, die in der Nähe des N-Terminus eines potentiell helicalen Peptids gebunden sind, dieses erheblich stabilisieren. Bei den hier untersuchten templatsubstituierten Modellpeptiden wird der stabilisierende Effekt spezifisch durch chaotrope Anionen einer bestimmten Größe hervorgerufen. Als besonders effektiv erwies sich

das Perchloration. Über die hier erstmalig beschriebene bemerkenswerte Stabilisierung kurzer, ungeladener Peptide hinaus könnten unsere Befunde auch für die Faltung partiell helicaler Proteinintermediate von Bedeutung sein. Diese Intermediate reagieren möglicherweise äußerst empfindlich auf lokal gebundene Anionen, die darüber hinaus auch eine wichtige steuernde Rolle in den komplexen proteinabhängigen Signalübertragungswegen spielen könnten.

Experimentelles

Die Peptide wurden nach Lit. [7] synthetisiert und durch wiederholte präoperative Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Alle Substanzen wurden durch Elektrospray-Ionisierungs(EI)-MS charakterisiert. Die Reinheit der Peptide ist in allen Fällen größer 95% (HPLC). Die CD-Spektren wurden mit einem thermostabilisierten Aviv-62DS-Circulardichroismus-Spektrometer, das nach bekannten Methoden kalibriert wurde, aufgenommen.^[12] Die pH-Werte wurden bei 20°C mit einem PHM240-pH-Meter von Radiometer Copenhagen bestimmt.

In den Hintergrundinformationen sind die Salz- und Säuretitrationskurven der untersuchten Peptide, die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-spektroskopischen Daten für die Peptide **1** und **5** sowie das CD-Spektrum von **3** zu finden.

Eingegangen am 30. April 2001 [Z17020]

- [1] Ac-Hel ist ein N-acetyliertes, durch eine Thiomethylenetherbrücke konformativ fixiertes Diprolinderivat. Als N-terminale Kappe eines Peptides induziert es die Bildung einer Helix: 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.
- [2] K. D. Collins, M. W. Washabaugh, *Q. Rev. Biophys.* **1985**, *18*, 323–422.
- [3] a) D. Hamada, S.-I. Kidokoro, H. Fukada, K. Takahashi, Y. Goto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10325–10329; b) R. M. Lynn, Y. Konishi, H. A. Scheraga, *Biochemistry* **1984**, *23*, 2470–2477.
- [4] a) G. Conio, V. Trefiletti, F. Bodria, C. Troglia, E. Patrone, *Biopolymers* **1974**, *13*, 1483–1498; b) J. Bello, *Biopolymers* **1988**, *27*, 1627–1640; c) J. Bello, *Biopolymers* **1992**, *32*, 185–188; d) M. Hosohino, Y. Goto, *J. Biochem.* **1994**, *116*, 910–915.
- [5] Der Abstand zwischen N-1 und CO-3 der Spacereinheit tLIn₂ beträgt 13 Å; J. S. Miller, R. J. Kennedy, D. S. Kemp, *Biochemistry* **2001**, *40*, 305–309.
- [6] a) W. Shalongo, L. Dugad, E. Stellwagen, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2500–2507; b) H. Saito, T. Ohki, M. Kodama, C. Nagata, *Biopolymers* **1978**, *17*, 2587–2599.
- [7] D. S. Kemp, T. J. Allen, S. Oslick, J. G. Boyd, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4240–4248.
- [8] J. M. Scholtz, R. L. Baldwin, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4604–4608.
- [9] U. Goto, N. Takahashi, A. L. Fink, *Biochemistry* **1990**, *29*, 3480–3488.
- [10] Y. Goto, S. Aimoto, *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 3887–3896.
- [11] R. R. Copley, G. J. Barton, *J. Mol. Biol.* **1994**, *242*, 321–329.
- [12] G. C. Chen, J. T. Yang, *Anal. Lett.* **1977**, *10*, 1195–1207.

Hydrophilie und Lipophilie von Cellulose-Kristalloberflächen

Oliver Biermann, Erich Hädicke,
Sebastian Koltzenburg und Florian Müller-Plathe*

Cellulose gehört zu den am häufigsten vorkommenden Biopolymeren und ist ein Ausgangsprodukt für viele industrielle Derivate und Produkte. Die Physik und Chemie ihrer Oberfläche sind wichtig für das Verständnis der Adhäsion an andere Materialien (z.B. in Nanoverbundwerkstoffen von celluloseverstärkten Thermoplasten),^[1] der Adsorption aus Lösungen (z.B. in der Papierherstellung)^[2] und von industriellen Verfahren, die von Cellulose-Aufschlammungen ausgehen (z.B. in Derivatisierungen von Cellulose, wo die erhaltenen Substitutionsmuster häufig der Intuition zuwiderlaufen).^[3] Obwohl wichtig in vielen Bereichen von Chemie, Biologie und Technik, ist die Celluloseoberfläche nicht gut verstanden. Die Lage wird noch komplizierter durch das gleichzeitige Vorliegen verschiedener Phasen in natürlicher und verarbeiteter Cellulose. Es gibt drei wichtige kristalline Phasen: triklin (Typ I α), monoklin (Typ I β) und Typ II, jede mit zwei möglichen Oberflächen, dazu wechselnde Anteile amorphen Materials. Von diesen Phasen ist nicht einmal das Verhalten der kristallinen Oberflächen gegenüber Wasser oder hydrophoben Organika auf molekularer Ebene charakterisiert.

Molekulardynamik(MD)-Simulationen mit empirischen Kraftfeldern beschreiben molekulare Systeme detailliert. Sie liefern zu experimentellen Befunden komplementäre Informationen unter der Voraussetzung, dass das Kraftfeld realistisch ist, dass das System groß genug gewählt wurde, um Finite-size-Effekte zu vermeiden, und dass die Simulation lang genug ist, um den relevanten Phasenraum abzudecken.^[4] Zum besseren Verständnis der Celluloseoberflächen haben wir daher MD-Simulationen durchgeführt. Sie zielen vor allem auf eine Charakterisierung des Verhaltens von Cellulose gegenüber Wasser (Hydrophilie/Hydrophobie) und gegenüber den apolaren Gruppen organischer Moleküle (Lipophilie/Lipophobie). Unsere Simulationsverfahren liefern die ortsauflösten Freien Energien für die Adsorption der entsprechenden Gruppen, sodass wir Hydrophilie- und Lipophilie-Landkarten erzeugen können. Eine vergleichende Untersuchung aller möglichen Celluloseoberflächen wäre aus wissenschaftlicher und technologischer Sicht wünschenswert. Aus Rechenzeitgründen müssen wir uns hier aber auf die beiden möglichen Oberflächen von Cellulose I β beschränken.

Experimentell wurde die Oberfläche kristalliner Cellulose durch Kraftmikroskopie (AFM) abgebildet. Ein wichtiger Befund ist, dass die Kristallstruktur an der Oberfläche erhalten bleibt. Dies wird durch die weitgehende Überein-

[*] Priv.-Doz. Dr. F. Müller-Plathe, Dipl.-Chem. O. Biermann
Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)
Fax: (+49) 6131-379-340
E-mail: mplathe@mpip-mainz.mpg.de
Dr. E. Hädicke, Dr. S. Koltzenburg
BASF AG
67056 Ludwigshafen (Deutschland)