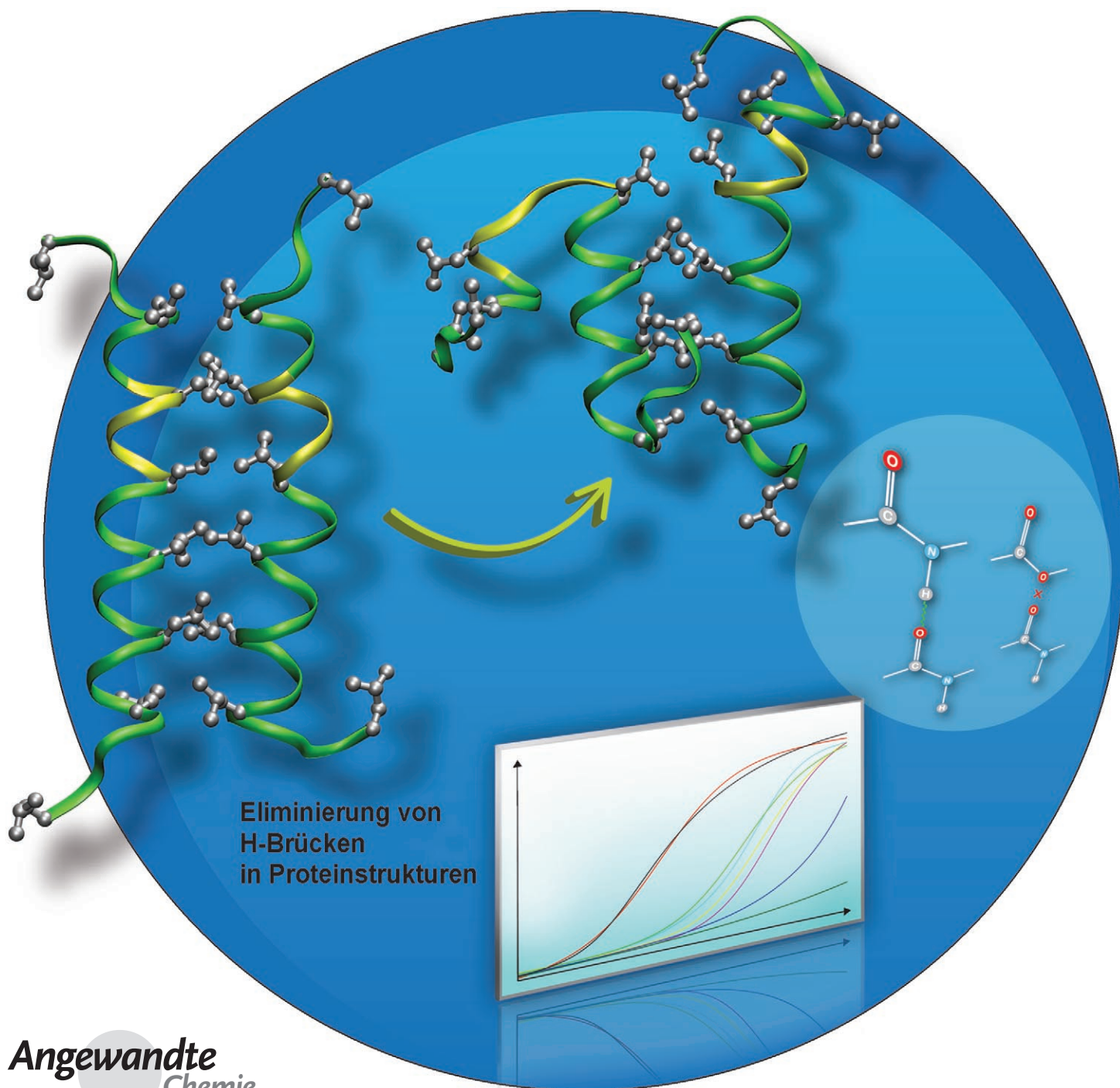


Estersubstitutionen in α -helical Coiled-Coil-Peptiden: Effekt der Eliminierung von Wasserstoffbrücken auf die Struktur von Proteinen**

Jessica A. Scheike, Carsten Baldauf, Jan Spengler, Fernando Albericio, M. Teresa Pisabarro und Beate Kokschr*



Für die Vorhersage von Struktur und Faltung von Proteinen ist die Klärung des Einflusses von Wasserstoffbrücken von entscheidender Bedeutung.^[1–5] „Amid-zu-Ester“-Substitutionen haben sich hierbei als nützliches Hilfsmittel erwiesen, um den Effekt der Wasserstoffbrücken im Peptidrückgrat auf die Strukturbildung und Stabilität von Peptiden und Proteinen zu untersuchen.^[6–16] Um den umgebungsabhängigen Einfluss von Wasserstoffbrücken zu studieren, wurde ein kombinierter Ansatz aus experimentellen Techniken und Moleküldynamik(MD)-Simulationen angewendet.

Der Austausch einer α -Aminosäure in einer Peptidsequenz gegen die entsprechende α -Hydroxysäure resultiert in der Bildung einer Esterbindung (auch Depsibindung). Die Substitution des Wasserstoffbrückendonors (NH) durch das Sauerstoffatom des eingeführten Esters ermöglicht die selektive Eliminierung einzelner Wasserstoffbrücken aus dem Peptid- oder Proteinrückgrat (Abbildung 1 a). α -Hydroxysäuren sind isostrukturell zu α -Aminosäuren, d.h., die grundlegenden strukturellen Eigenschaften werden beibehalten. Abgesehen von den Auswirkungen der Eliminierung der Wasserstoffbrücken sind also keine gravierenden Störungen zu erwarten.^[8,9] Somit sind α -Hydroxysäurebausteine zur Untersuchung des Einflusses von Wasserstoffbrücken des Peptidrückgrats auf die Struktur und Stabilität von Proteinen hervorragend geeignet.

In vorausgegangenen Studien wurden hauptsächlich monomere α -Helices,^[7–10] β -Faltblätter^[11,12] oder komplexe Proteine^[13–16] als Modellsysteme genutzt, um die Auswirkungen bestimmter Wasserstoffbrücken auf die Faltung und Stabilität dieser Systeme zu untersuchen. Dawson et al. untersuchten den Einfluss von Depsibindungen auf die Strukturbildung in der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne einer α -helicalen Superhelix (Coiled-Coil).^[6] Sequenzen mit der charakteristischen heptameren Wiederholungssequenz (heptad repeat) bilden bereits ab einer Länge von ca. 20 Aminosäuren ein stabiles α -helicales Coiled-Coil in Lösung. Die Quartärstruktur des Coiled-Coils weist sowohl lösungsmittel-exponierte Regionen als auch eine interhelicale hydrophobe

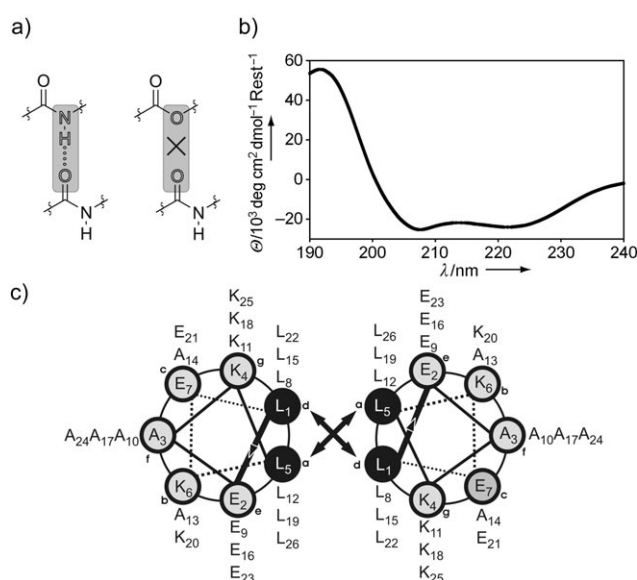


Abbildung 1. a) Die Einführung einer Esterbindung resultiert in der Eliminierung einer Wasserstoffbrücke. b) CD-Spektrum des Basispeptids pp. c) Helixrad-Darstellung des Homodimers des Basispeptids.

Wechselwirkungsdomäne auf. Damit ist das Coiled-Coil-Dimer ein ideales Faltungsmotiv zur kontextabhängigen Untersuchung des Einflusses von Wasserstoffbrücken auf Faltung und Stabilität von Peptiden und Proteinen. Basierend auf dem Coiled-Coil-Motiv wurde eine kleine Peptidbibliothek synthetisiert, in der Depsibindungen in hydrophoben und solvatisierten Positionen des Coiled-Coils eingeführt wurden.

Das α -helicale Coiled-Coil-Strukturmotiv ist gut charakterisiert und in der Natur weit verbreitet. Es besteht aus mehreren α -Helices, die eine superhelicale Quartärstruktur bilden.^[17–20] Die Struktur wird durch die charakteristische heptamere Wiederholungssequenz (a-b-c-d-e-f-g)_n bestimmt, bei der die Positionen a und d mit hydrophoben Aminosäuren besetzt sind, die eine Wechselwirkungsdomäne bilden. Hierbei fügen sich die Seitenketten der hydrophoben Aminosäurereste der einen Helix in die komplementären Hohlräume der anderen Helix ein und bilden ein so genanntes „knobs into holes“-Muster. Die solvatisierten Positionen b, c, e, f und g sind hauptsächlich mit polaren oder geladenen Aminosäuren besetzt.

Das Basispeptid (parent peptide, pp; Tabelle 1), von dem alle weiteren Peptide dieser Studie abgeleitet sind, ist ein 26 Aminosäuren langes, de novo entworfenes α -helicales Coiled-Coil-Homodimer mit paralleler Anordnung. Wir haben in der vorliegenden Studie systematisch einzelne Depsibindungen durch Festphasenpeptidsynthese eingeführt und die Faltungsstabilitäten anschließend mithilfe von CD-Spektroskopie und MD-Simulationen untersucht.

Das CD-Spektrum des pp zeigt die erwartete α -helicale Konformation (Abbildung 1 b). Ein Gelfiltrationschromatogramm zeigt nur einen symmetrischen Peak, was auf die ausschließliche Bildung eines Coiled-Coil-Homodimers hinweist (siehe Hintergrundinformationen). Wir haben an verschiedenen Positionen des Coiled-Coils einzelne Depsibin-

[*] Dipl.-Chem. J. A. Scheike, Prof. B. Kokschi
Institut für Chemie und Biochemie
Freie Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-838-55644
E-Mail: kokschi@chemie.fu-berlin.de
Homepage: <http://userpage.chemie.fu-berlin.de/~akkokschi/>
Dr. C. Baldauf, Dr. M. T. Pisabarro
Strukturelle Bioinformatik
Biotechnologiezentrum der TU Dresden
Tatzberg 47–51, 01307 Dresden (Deutschland)
Dr. J. Spengler, Prof. F. Albericio
Institute for Research in Biomedicine
Barcelona Science Park, University of Barcelona
Josep Samitier 1–5, 08028 Barcelona (Spanien)

[**] Diese Studie wurde vom Freistaat Sachsen, der Klaus-Tschira-Stiftung und der Generalitat de Catalunya (2005SGR 00662) unterstützt. Wir danken Dr. Alberto Adeva (Universität Barcelona) für technische Unterstützung.

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

Tabelle 1: Sequenzliste der untersuchten Peptide.

Peptid ^[a]	Sequenz ^[a]
pp	H ₂ N-LEAKLKELEAKLALEAKLKELEAKL-COOH
L5λ	H ₂ N-LEAKλKELEAKLALEAKLKELEAKL-COOH
A10α	H ₂ N-LEAKLKELEAKαLALEAKLKELEAKL-COOH
K11κ	H ₂ N-LEAKLKELEAKLALEAKLKELEAKL-COOH
L12λ	H ₂ N-LEAKLKELEAKλALEAKLKELEAKL-COOH
A13α	H ₂ N-LEAKLKELEAKLαALEAKLKELEAKL-COOH
L22λ	H ₂ N-LEAKLKELEAKLALEAKLKELEAKL-COOH
L12λ A13α	H ₂ N-LEAKLKELEAKλALEAKLKELEAKL-COOH

[a] Die griechischen Kleinbuchstaben geben den Einbuchstabencode der α-Hydroxysäuren an und entsprechen dem Einbuchstabencode der analogen α-Aminosäuren.^[12,14]

dungen eingeführt (Tabelle 1): 1) nahe des N- und C-Terminus (L5λ und L22λ) und 2) in der Mitte der Sequenz entweder in hydrophober (L12λ) oder lösungsmittel exponierter Umgebung (A10α, K11κ und A13α). Des Weiteren wurden in der Mitte der Sequenz zwei aufeinander folgende Depsibindungen eingeführt (L12λA13α).

Die Depsibindungen der Varianten L5λ und L22λ befinden sich jeweils in einem Abstand von fünf Aminosäuren vom N- bzw. C-Terminus. Beide Varianten zeigen in Abwesenheit des denaturierenden Agens Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl) eine dem pp analoge α-helicale Coiled-Coil-Struktur (Abbildung 2a). Allerdings zeigen die Denaturierungskurven deutliche Stabilitätsunterschiede zwischen beiden Depsipeptiden. Während das N-terminal substituierte L5λ gegenüber pp unverändert stabil ist, ist das C-terminal substituierte Depsipeptid L22λ um 1.4 kcal mol⁻¹ destabilisiert (Tabelle 2). Die MD-Simulationen stimmen mit diesen experimentellen Daten überein. Abbildung 3a zeigt deutlich, dass der N-Terminus des pp sehr flexibel ist. Daher wird die Wasserstoffbrücke zwischen der Carbonylfunktion von L1 und dem Amidwasserstoff von L5 nicht ausgebildet, und folglich hat die Estersubstitution in Position 5 keinen negativen Einfluss auf die Stabilität des Coiled-Coils. Abbildung 3b zeigt hingegen deutlich, dass beim pp die Wasserstoffbrücke zwischen den Resten L22 und K18 hoch konserviert ist. Demzufolge erhalten wir für L22λ anders als für L5λ deutliche strukturelle Unterschiede in der MD-Simulation. Im Fall von L5λ zeigt die Wasserstoffbrücke entlang der Helixachse nach außen. Daher ist diese Wasserstoffbrücke von untergeordneter Bedeutung für den additiven Charakter von Wasserstoffbrücken in Helices und ist zudem wegen der Flexibilität des Terminus nur sehr selten ausgebildet. Demgegenüber ist das Amidproton von L22 der erste Wasserstoffbrückendonator in einer Reihe von weiteren Wasserstoffbrücken und ist daher von großer Bedeutung für den Dipol der Helix. Zusammenfassend ist im Fall von L5λ der Wasserstoffbrückenakzeptor in seiner Orientierung zu flexibel, um das Fehlen einer Wasserstoffbrücke überhaupt zu realisieren, wohingegen der Akzeptor des Amidprotons von L22 starr orientiert ist.

Das Depsipeptid A10α wird beispielhaft für alle vorgenommenen Substitutionen in der solvatisierten Flanke der Helix (A10α K11κ, A13α) betrachtet. Bei L12λ befindet sich die Depsibindung hingegen mittig in der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne des Coiled-Coils. Das CD-Spek-

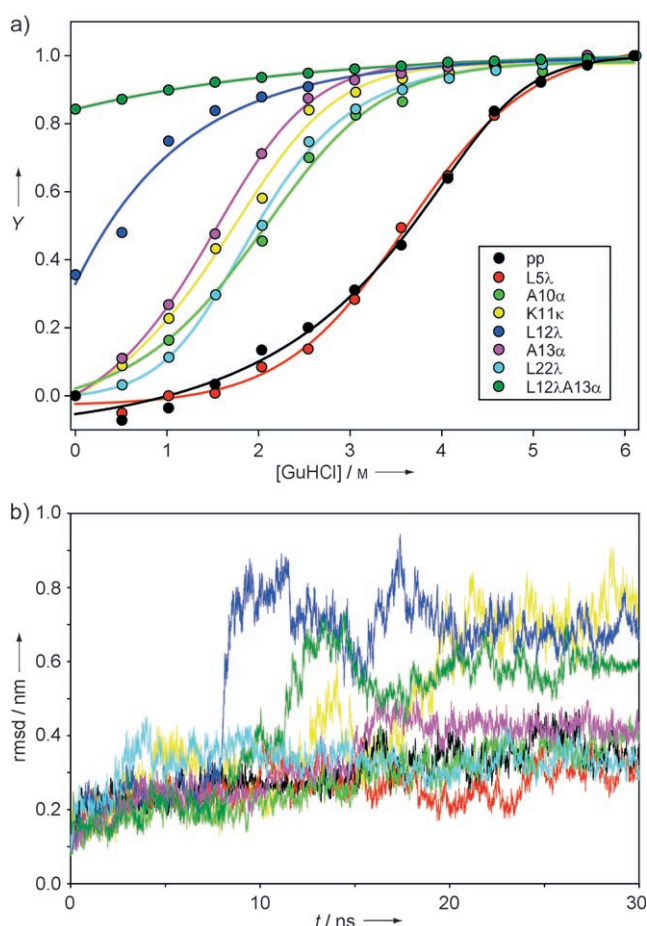


Abbildung 2. Korrelation der experimentellen Ergebnisse mit den MD-Simulationen. a) CD-Denaturierungskurven des pp und der Depsipeptide; γ = Anteil an entfaltetem Peptid. b) rmsd-Werte der Rückgratpositionen während der MD-Simulation (gleicher Farbcode wie bei a).

Tabelle 2: Durch Denaturierung mit GuHCl ermittelte relative thermodynamische Stabilitäten. Negative $\Delta\Delta G_U^{H_2O}$ -Werte stehen für Stabilitäten kleiner als die des pp.

Peptid	$D_{50\%}$ ^[a]	m ^[b]	$\Delta G_U^{H_2O}$ ^[c]	$\Delta\Delta G_U^{H_2O}$ ^[c]
pp	3.62	0.92	3.32	0
L5λ	3.57	1.09	3.90	-0.05
A10α	2.13	0.76	1.63	-1.25
K11κ	1.76	0.73	1.28	-1.53
L12λ	0.35	–	–	–
A13α	1.53	0.81	1.25	-1.81
L22λ	2.04	0.83	1.69	-1.38

[a] In M GuHCl. [b] In kcal mol⁻¹ M⁻¹. [c] In kcal mol⁻¹.

trum von A10α zeigt den charakteristischen Kurvenverlauf eines α-helicalen Coiled-Coil-Peptids. Im Unterschied zu diesem deutet das CD-Spektrum von L12λ schon in Abwesenheit von GuHCl auf einen verringerten helicalen Anteil hin. Der Denaturierungskurve entsprechend ist A10α gegenüber pp um 1.3 kcal mol⁻¹ destabilisiert (Tabelle 2). Da die Denaturierungskurve von L12λ kein unteres Plateau aufweist, ist der $\Delta\Delta G_U$ -Wert nicht exakt bestimmbar. Die zugehörigen MD-Simulationen vom pp zeigen, dass die Abstände zwischen dem Amid-N und dem Carbonyl-O, die an der

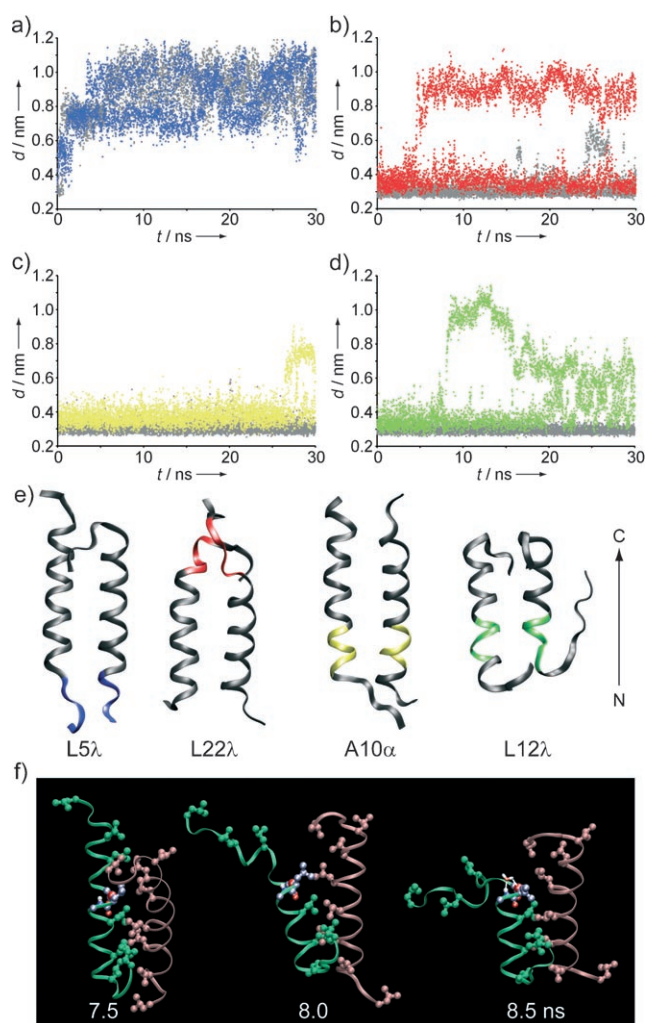


Abbildung 3. Abstände d zwischen den Amid-N- und den Carbonyl-O-Atomen, die an Wasserstoffbrücken in pp beteiligt sind, und die entsprechenden Abstände zwischen Depsi-O- und Carbonyl-O-Atomen der Depsipeptide L5 λ (blau, a) und L22 λ (rot, b), A10 α (gelb, c) und L12 λ (grün, d). e) Repräsentative Einzelstrukturen aus den Trajektorien. f) Entfaltung der N-terminalen Region von L12 λ .

Wasserstoffbrücke beteiligt sind, konstant 3 Å betragen. Interessanterweise ist der Abstand zwischen dem eingeführten Ester-O und dem Carbonyl-O bei A10 α während der MD-Simulation zwar leicht vergrößert, aber durchgehend um 4 Å fixiert (Abbildung 3c). Während A10 α über die gesamte Simulationszeit von 30 ns eine stabile Coiled-Coil-Struktur beibehält, entfaltet sich L12 λ schon nach 7 ns. Dies wird an dem signifikant größer werdenden Abstand zwischen dem Depsi-O und dem Carbonyl-O beobachtet (Abbildung 3d). Die hydrophobe Wechselwirkungsdomäne bricht auf, und der N-terminale Teil der Helix entfaltet sich.

Die Ursache für das unterschiedliche Verhalten von Peptiden mit einer Depsibindung in der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne im Vergleich zu Peptiden mit einer Depsibindung in der solvatisierten Flanke der Coiled-Coil-Helix beruht auf der umgebungsabhängigen Stärke von Wasserstoffbrücken.^[14,22] In den lösungsmittel-exponierten Regionen tragen die Wasserstoffbrücken intrinsisch weniger

zur Stabilität der Struktur bei, was auf den abschirmenden Effekt des Lösungsmittels zurückzuführen ist.^[23] Der abstoßende Effekt zwischen den partiell negativ geladenen Ester- und Carbonylsauerstoffatomen wird sowohl durch die allgemeinen dielektrischen Eigenschaften des Lösungsmittels als auch durch explizite Wechselwirkungen mit Wassermolekülen abgeschirmt. In der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne sind indes keine alternativen Wechselwirkungen mit Wassermolekülen möglich. Zudem vermag die hydrophobe Umgebung mit ihrer niedrigen Dielektrizitätskonstante die Abstoßung zwischen den partiell negativ geladenen Sauerstoffatomen nicht abzuschirmen. Das Fehlen eines Wasserstoffatoms stört zudem die dichte Packung der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne. Dies führt zu einer schnellen irreversiblen Entfaltung des Coiled-Coils, und die Ester- und Carbonylsauerstoffatome der Depsipeptide werden im entfalteten Zustand durch Wechselwirkungen mit Wassermolekülen abgesättigt (Abbildung 3 f). Die Doppelsubstitution im Depsipeptid L12 λ A13 α resultiert schon in Abwesenheit von denaturierenden Reagentien in einem vollkommenen Verlust der α -helicalen Coiled-Coil-Struktur.

Wir konnten zeigen, dass der Einfluss von Wasserstoffbrücken auf die Proteinfaltung in großem Maße von der jeweiligen Umgebung abhängt. Der Effekt resultiert hauptsächlich aus dem drastisch herabgesetzten Einfluss des Lösungsmittels in den hydrophoben, abgeschirmten Regionen der Peptide und Proteine. Unsere Ergebnisse belegen also, dass Wasserstoffbrücken nicht die treibende Kraft für die Peptid- oder Proteinfaltung sind, allerdings wesentlich zur Erhaltung eines bestimmten Faltungsmusters beitragen.

Experimentelles

Das Basispeptid pp und die Depsipeptide wurden nach einer Boc-Schutzgruppenstrategie durch automatische Festphasenpeptidsynthese hergestellt, mit HPLC gereinigt und durch Massenspektrometrie charakterisiert. Alle CD-Spektren wurden bei einer Peptidkonzentration von 6 mg mL⁻¹ in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) und bei 20°C gemessen. Die Denaturierung der Peptide wurde durch Zugabe von GuHCl induziert. MD-Simulationen wurden unter Verwendung der Gromacs-Programmsammlung^[24] und des Gromos-53a6-Kraftfelds^[25] durchgeführt. Die Coiled-Coil-Dimere wurden in einer dodekaedrischen Box mit 9500 Wassermolekülen (simple point charge, SPC) platziert. Einzelheiten sind in den Hintergrundinformationen zugänglich.

Eingegangen am 20. Mai 2007

Online veröffentlicht am 17. September 2007

Stichwörter: Depsipeptide · Moleküldynamiksimulation · Proteinfaltung · Superhelices · Wasserstoffbrücken

- [1] K. A. Dill, *Biochemistry* **1990**, 29, 7133.
- [2] E. Lacroix, A. R. Viguera, L. Serrano, *J. Mol. Biol.* **1998**, 284, 173.
- [3] N. Ferguson, J. R. Pires, F. Toepert, C. M. Johnson, Y. P. Pan, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, V. Daggett, H. Oshkinat, A. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 13008.
- [4] M. Gruebele, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 161.
- [5] R. L. Baldwin, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 17581.

- [6] J. W. Blankenship, R. Balambika, P. E. Dawson, *Biochemistry* **2002**, *41*, 15676.
- [7] A. S. Cieplak, N. B. Surmeli, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3250.
- [8] I. L. Karle, C. Das, P. Balaram, *Biopolymers* **2001**, *59*, 276.
- [9] T. Ohyama, H. Oku, M. Yoshida, R. Katakai, *Biopolymers* **2001**, *58*, 636.
- [10] J. T. Koh, V. W. Cornish, P. G. Schultz, *Biochemistry* **1997**, *36*, 11314.
- [11] Y. W. Fu, J. M. Gao, J. Bieschke, M. A. Dendle, J. W. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15948.
- [12] S. Deechongkit, P. E. Dawson, J. W. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16762.
- [13] M. Wang, T. E. Wales, M. C. Fitzgerald, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2600.
- [14] E. T. Powers, S. Deechongkit, J. W. Kelly, *Adv. Protein Chem.* **2005**, *72*, 39.
- [15] X. Y. Yang, M. Wang, M. C. Fitzgerald, *Bioorg. Chem.* **2004**, *32*, 438.
- [16] J. K. Myers, C. N. Pace, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2033.
- [17] J. M. Mason, K. M. Arndt, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 170.
- [18] Y. B. Yu, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 1113.
- [19] Á. Piñeiro, A. Villa, T. Vagt, B. Koks, A. E. Mark, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 3701.
- [20] K. Pagel, K. Seeger, B. Seiwert, A. Villa, A. E. Mark, S. Berger, B. Koks, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1189.
- [21] J. J. Dannenberg, *J. Mol. Struct.* **2002**, *615*, 219.
- [22] H. Umeyama, K. Morokuma, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1316.
- [23] F. M. Dicapua, S. Swaminathan, D. L. Beveridge, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6145.
- [24] E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, *J. Mol. Model.* **2001**, *7*, 306.
- [25] C. Oostenbrink, A. Villa, A. E. Mark, W. F. Van Gunsteren, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1656.