

# Die Quadrupolwechselwirkung als zusätzliches Hilfsmittel für das Peptiddesign

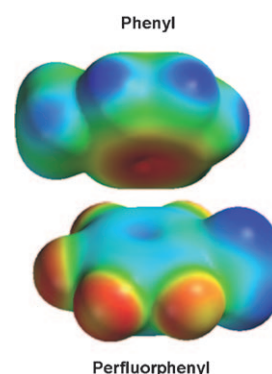
Hana Robson Marsden, Johannes G. E. M. Fraaije und Alexander Kros\*

Elektrostatische Wechselwirkungen · Molekulare Erkennung · Peptide · Quadrupol-Wechselwirkungen · Selbstorganisation

**P**roteine und Peptide werden oft als Maschinerie des Lebens beschrieben. Schon die einfachsten Bakterien haben Hunderte von Proteinen; zusammen üben diese Proteine Tausende von unterschiedlichen Funktionen aus. Die Zuverlässigkeit dieser Funktionen hängt von der Spezifität ab, mit der die einzelnen Komponenten der Maschinerie, die Proteine, miteinander wechselwirken.

Studiert man die Formen und Funktionen von Proteinen und führt diese auf ihre Aminosäuresequenz zurück, so kann man die „Regeln“ der Selbstorganisation des Peptids aufdecken, wodurch wiederum das De-novo-Design von Peptiden sowie neuartige Formen und Funktionen zugänglich werden.<sup>[1]</sup> Gut verstanden ist das Design linearer Aminosäuresequenzen, die sich zu definierten Sekundärstrukturen oder -motiven falten, etwa zu  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblättern. Eine schwierigere Aufgabe ist das Maßschneidern von spezifischen Wechselwirkungen zwischen diesen Motiven, d.h. zwischen exakt positionierten Seitenketten. Durch bessere Kontrolle der intermolekularen Wechselwirkungen lässt sich die Funktionalität des hergestellten Peptidaggregats und entsprechend sein Anwendungspotenzial verbessern.

Bis vor kurzem bestand das Repertoire chemischer Hilfsmittel, mit dem eine molekulare Peptid-Peptid-Erkennung induziert werden kann, aus vier nichtkovalenten Wechselwirkungen von Aminosäure-Seitenketten: ionischen Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, hydrophoben Wechselwirkungen und  $\pi$ -Stapelung.<sup>[2]</sup> Unlängst beschrieben Zheng und Gao nun ein neues Instrument, nämlich die Quadrupolwechselwirkung (Abbildung 1), eine Verfeinerung der  $\pi$ -Stapelung.<sup>[3]</sup> Wie diese Hilfsmittel angewendet werden, um die Peptid-Peptid-Wechselwirkungen spezifisch zu machen, wird in diesem Highlight besprochen. Hauptsächlich geht es hierbei um die Doppelwendel(Coiled-Coil)-Aggregationsform, die innerhalb der „Peptidmaschinerie“ am besten verstanden ist.<sup>[4,5]</sup>



**Abbildung 1.** Kalottenmodell der Fläche auf Fläche gestapelten aromatischen Seitenketten von Phenylalanin und Perfluorphenylalanin. Gezeigt ist die Verteilung des elektrostatischen Potentials; blau: positiv; rot: negativ. Phenyl und Perfluorphenyl haben ein entgegengesetztes Quadrupolmoment, was eine elektrostatische Nettoanziehung zwischen den  $\pi$ -Oberflächen ermöglicht.<sup>[3]</sup>

1. **Hydrophobe Wechselwirkungen:** Im Allgemeinen ist der hydrophobe Effekt die stärkste Komponente bei Wechselwirkungen, die die Quartärstruktur von Proteinen und Peptiden aufbauen. Besonders wichtig zur Stabilitätsverstärkung der Komplexe ist der Grad der sterischen Passgenauigkeit hydrophober Seitenketten. Allerdings sind diese Wechselwirkungen nicht so spezifisch wie die Wechselwirkungen zwischen hydrophilen Seitenketten. Bei den Doppelwendelstrukturen waren hydrophobe Designprinzipien am effizientesten für die Festlegung des Oligomerisierungsgrades oder der relativen Orientierung von  $\alpha$ -Helices in Komplexen und nicht so sehr für die Spezifizierung der Bindungspartner. In De-novo-Peptiden wird diese starke, aber nichtexklusive Form der molekularen Erkennung durch andere Mechanismen spezifischer Bindung ergänzt.
2. **Ionische Wechselwirkungen:** Aminosäuren mit geladener Seitenkette sind wichtige Faktoren für die Einführung von Spezifität in Peptidkomplexe, und diese Strategie wird auch am häufigsten angewendet. Oft wird die Spezifität durch ein „negatives Design“ erreicht, d.h., eine bestimmte Struktur bildet sich durch Destabilisierung der anderen Komplexmöglichkeiten.<sup>[6]</sup> Viele heterodimere Doppelwendelstrukturen haben angrenzend an den hy-

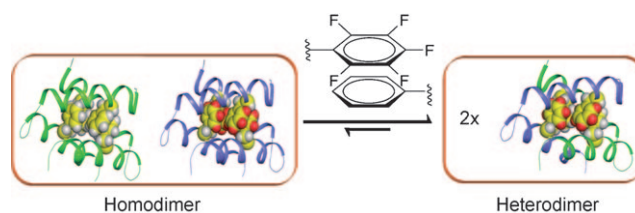
[\*] Dr. H. Robson Marsden, Prof. Dr. J. G. E. M. Fraaije, Dr. A. Kros  
Soft Matter Chemistry, Leiden Institute of Chemistry  
Leiden University  
P.O. Box 9502, 2300 RA, Leiden (Niederlande)  
Fax: (+31) 71-527-4397  
E-Mail: a.kros@chem.leidenuniv.nl  
Homepage: <http://smc.lic.leidenuniv.nl>

drophoben Kern geladene Reste, die so angeordnet sind, dass die eine Helix positiv und die andere negativ geladen ist, sodass keine Homodimere gebildet werden können. Auch durch Kontrolle der intermolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen durch Änderungen im pH-Wert oder der Salzkonzentration lässt sich die Bindungsspezifität des Peptids ändern. Dieses Konzept wurde anhand iterativer pH-Zyklen demonstriert, durch die spezifisch eine, zwei oder alle drei Helices einer ursprünglich trimeren Doppelwendelstruktur ausgetauscht wurden.<sup>[6]</sup>

3. Wasserstoffbrücken: Auch mit Wasserstoffbrücken lässt sich in die Doppelwendelstrukturen Spezifität einführen, indem Wasserstoffbrücken bildende Reste in den hydrophoben Kern eingebaut werden. Der korrekte Einbau von polaren Resten, die Wasserstoffbrücken bilden können, begünstigt eine bestimmte Niedrigenergiestruktur gegenüber anderen möglichen Strukturen. Welch hohe Bindungsspezifität die Wasserstoffbrücken in die Doppelwendel-Wechselwirkung einbringen, zeigte beispielhaft die Bildung von drei verschiedenen Heterodimeren aus Lösungen von sechs Peptiden. Die Selektivität entstand durch den Austausch einer einzigen (entweder natürlichen oder von Harnstoff abgeleiteten) Wasserstoffbrücken bildenden Aminosäure in einer Kernposition des jeweiligen Peptids.<sup>[7]</sup>
4.  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen: Aromatische Wechselwirkungen haben eine hydrophobe und eine elektrostatische Komponente, die sich aus dem Quadrupolmoment ergibt.<sup>[8]</sup> Im Proteinzentrum sind derartige Wechselwirkungen häufig anzutreffen und dienen zur Stabilisierung von Peptidwechselwirkungen von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern. Wie die hydrophoben Wechselwirkungen wurden auch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen vor allem dafür genutzt, um spezifische Konfigurationen in Homokomplexen zu stabilisieren, weniger zur Induktion von spezifischen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Peptiden.<sup>[8]</sup> Wegen ihrer Komplexität infolge der schlecht bestimmbar hydrophoben und elektrostatischen Komponenten, variabler Packungsgeometrien und Wechselwirkungen mit anderen Einheiten sind  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen als Hilfsmittel zum Peptiddesign noch nicht gut verstanden.

Nun haben Zheng und Gao gezeigt, dass die Quadrupolwechselwirkung als neues Instrument genutzt werden kann, um Peptidwechselwirkungen spezifisch zu machen. In einer aktuellen Arbeit demonstrieren sie, wie eine korrekte Platzierung von aromatischen und perfluorierten aromatischen Ringen gezielt selektive Protein-Protein-Wechselwirkungen hervorbringen kann.<sup>[3]</sup> Das Peptid  $\alpha_2$ D faltet normalerweise zu einem Homodimer, bei dem jedes Peptid eine Helix-Schleife-Helix-Konformation einnimmt. Dabei geht eine Phenylalaninseitenkette jeder Helix eine Fläche-auf-Fläche-Stapelung ein, wodurch ein hydrophober Kern aufgebaut wird. Eine Doppelmutante, bei der beide Phenylalaninreste gegen ihre fluorierten Gegenstücke ausgetauscht sind, bildet ebenfalls ein Dimer mit der gleichen Struktur. Der fluorierte Komplex ist stabiler (Schmelztemperatur 80°C bei 25  $\mu$ M gegenüber 30°C für den Wildtyp), denn die Fluoratome sind hydrophober als die Wasserstoffatome. Werden beide stabi-

len Dimere gemischt, findet ein vollständiger Übergang vom Homo- zum Heterodimer statt (Abbildung 2).<sup>[3]</sup> Die Spezifität des Heterodimers beruht auf der Quadrupolwechselwir-



**Abbildung 2.** Durch die Quadrupolstapelung zwischen aromatischen Ringen und ihren perfluorierten Gegenstücken können spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen erzeugt werden. Dies resultiert in der exklusiven Bildung von Heterodimeren, wenn zwei entsprechende Homodimerpaare gemischt werden.<sup>[3]</sup>

kung zwischen den gestapelten aromatischen und perfluoraromatischen Ringen. Zu dieser molekularen Erkennung kommt es deswegen, weil das elektrostatische Potential des aromatischen Moleküls innerhalb des Rings negativ ist; der perfluorierte Ring hat zwar ein fast ebenso großes Quadrupolmoment, zeigt aber wegen der Elektronen ziehenden Fluorsubstituenten eine umgekehrte Polarität mit negativem elektrostatischem Potential an den Fluoratomen außerhalb des Rings. Diese Ladungsanordnung führt zu einer elektrostatischen Nettoanziehung zwischen den parallelen  $\pi$ -Flächen (Abbildung 1).

Der Beitrag, den jedes Phenylalanin-Perfluorphenylalanin-Paar zu der Bindungsenergie des Dimers leistet, wurde mithilfe von einem Doppelmutationszyklus zu  $-(1.0 \pm 0.3)$  kcal mol<sup>-1</sup> abgeschätzt.<sup>[3]</sup> Dieser Wert ist in seiner Größenordnung vergleichbar mit dem Beitrag schwacher Wasserstoffbrücken und allgemein kleiner als der Beitrag ionischer und hydrophober Wechselwirkungen. Üblicherweise haben Proteine und Peptide eine Faltungstabilität von annähernd 5–10 kcal mol<sup>-1</sup>,<sup>[8]</sup> die sich aus einer Kombination von stabilisierenden und destabilisierenden Wechselwirkungen zusammensetzt. Der kombinierte Betrag dieser Energien ist um einiges größer als die Endsumme. Um das Resultat (bezüglich der Stabilität wie auch der Spezifität) infolge des Zusammenspiels nichtkovalenter Wechselwirkungen genauer vorhersagen zu können, wäre es nützlich, die Quadrupolwechselwirkung weiter zu quantifizieren.

Obwohl die Quadrupolwechselwirkung des Phenyl/Perfluorphenyl-Paars bekanntermaßen zur molekularen Erkennung kleiner Moleküle beitragen kann,<sup>[9,10]</sup> wurde in zwei früheren Arbeiten über die molekulare Erkennung von Peptiden oder Peptoiden unter Berücksichtigung von Quadrupolwechselwirkungen keine Stabilisierung beobachtet.<sup>[11,12]</sup> Grund dafür könnte das Nichterreichen einer präzisen Stapelgeometrie der aromatischen Ringe sein, die für die Stabilisierung notwendig ist. Daher ist es wahrscheinlich schwierig, trotz des leichten (chemischen wie auch rekombinanten) Einbaus von Fluorarenen in Peptidsequenzen entsprechende Sequenzen maßzuschneidern, bei denen die Phenyl- und Perfluorphenylseitenketten eine optimale Stapelgeometrie einnehmen.

Fassen wir zusammen: Durch Quadrupolwechselwirkung zwischen aromatischen und perfluorierten aromatischen Ringen konnte die Spezifität der Bindung zwischen Peptiden effektiv festgelegt werden. Diese Wechselwirkung bietet sich daher als neues Instrument für das Design spezifischer Peptidwechselwirkungen an. Damit sie aber allgemein und zuverlässig genutzt werden kann, sind weitere Untersuchungen nötig, bezüglich der Bindungsenergie wie auch der Bindungsgeometrie. Bereits deutlich wurde allerdings, dass die Quadrupolwechselwirkung das Repertoire der Designregeln ergänzt, die es ermöglichen, Peptide als anspruchsvolle Bausteine für den Aufbau von Nanomaterialien zu nutzen; damit erweitert sie auch das Spektrum an funktionellen Peptidagregaten.

Wir sind zwar nach wie vor recht weit davon entfernt, zuverlässig Peptide auf gewünschte Funktionen hin zu programmieren, dank der heute verfügbaren chemischen Hilfsmittel sind wir nun aber besser in der Lage, spezifische Wechselwirkungen zwischen Peptiden einzurichten. Je größer unser Repertoire an Hilfsmitteln wird, desto größer wird auch die Bandbreite möglicher „Peptidmaschinen“ werden.

Eingegangen am 23. Juni 2010

Online veröffentlicht am 4. Oktober 2010

- [1] S. Cavalli, F. Albericio, A. Kros, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 241–263.
- [2] R. V. Ulijn, A. M. Smith, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 664–675.
- [3] H. Zheng, J. Gao, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 8817–8821; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 8635–8639.
- [4] H. Robson Marsden, A. Kros, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 3050–3068; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2988–3005.
- [5] E. H. C. Bromley, K. Channon, E. Moutevelis, D. N. Woolfson, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 38–50.
- [6] N. A. Schnarr, A. J. Kennan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13046.
- [7] M. L. Diss, A. J. Kennan, *Org. Lett.* **2008**, 10, 3797–3800.
- [8] M. L. Waters, *Biopolymers* **2004**, 76, 435–445.
- [9] M. Weck, A. R. Dunn, K. Matsumoto, G. W. Coates, E. B. Lobkovsky, R. H. Grubbs, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2909–2912; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2741–2745.
- [10] F. Ponzini, R. Zagha, K. Hardcastle, J. S. Siegel, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2413–2415; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2323–2325.
- [11] S. M. Butterfield, P. R. Patel, M. L. Waters, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9751–9755.
- [12] B. C. Gorske, H. E. Blackwell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14378–14387.