

Kalte Ionenspektroskopie zur Lösung der Gasphasenstruktur eines Decapeptids**

Natalia S. Nagornova, Matteo Guglielmi, Manuel Doemer, Ivano Tavernelli,
Ursula Rothlisberger, Thomas R. Rizzo und Oleg V. Boyarkin*

In Erinnerung an Irina Boyarkine

Die dreidimensionale Struktur von Proteinen und Peptiden bestimmt in vivo weitgehend deren biologische Funktion. Die in vitro beobachteten Strukturen und deren Vielfalt resultieren aus dem feinen Gleichgewicht zwischen nichtkovalenten intramolekularen Wechselwirkungen und solchen mit den umgebenden Lösungsmittelmolekülen. Die Entkopplung von intra- und intermolekularen Wechselwirkungen und die Aufklärung der intrinsischen Strukturen von Biomolekülen ist entscheidend für das Verständnis von Protein-Peptid-Wechselwirkungen (ebenso wie Protein-Protein- und Protein-Membran-Wechselwirkungen) und Proteinfaltungen und kann zur computergestützten Entwicklung von Wirkstoffen beitragen. Hier demonstrieren wir, wie die kombinierte Verwendung von kalter Ionenspektroskopie und Computerberechnungen zur Aufklärung der 3D-Gasphasenstruktur eines natürlichen Antibiotikums, des Decapeptids Gramacidin S (GS), führt. Es ist das erste Mal, dass die Gasphasenstruktur eines Moleküls dieser Größe bestimmt werden kann.

Gramacidin S (cyclo-VOLFPVOLFP, wobei „O“ für Ornithin (Orn) steht und Phe als D-, nicht als L-Enantiomer vorliegt) ist durch seine praktische Bedeutung schon über Jahrzehnte Gegenstand intensiver Forschung.^[1–8] GS zeigt eine starke antibakterielle Aktivität, die auf seiner Bindung an mikrobielle Membranen beruht.^[5,6] Allerdings wirkt es toxisch auf menschliche rote Blutzellen. Die rationale Entwicklung von GS-Analogen mit verbesserter pharmakologischer Aktivität erfordert ein besseres Verständnis der Struktur von GS und seiner Wechselwirkung mit Lösungsmittelmolekülen und Phospholipiden der Zellmembranen. Die Struktur des isolierten Peptids kann daher als zusätzlicher

Startpunkt zur Modellierung dieser Wechselwirkungen und zur Aufklärung des Mechanismus seiner antibakteriellen Wirkung dienen.

Durch die Isolierung von lösungsmittelfreien Biomolekülen in der Gasphase entfallen intermolekulare Wechselwirkungen, allerdings verlangt die geringe Probenkonzentration hoch empfindliche, strukturselektive Methoden. Mithilfe von Ionenmobilitätsmessungen können konformere Strukturen anhand ihrer unterschiedlichen Stoßquerschnitte aufgetrennt werden.^[9–11] Dabei ist allerdings die Genauigkeit der Strukturaufklärung durch die geringe Zahl experimentell ableitbarer Randbedingungen begrenzt und sollte durch komplementäre Methoden unterstützt werden.

In den letzten Jahren konnten hochaufgelöste Strukturen von mehreren Aminosäuren und kleinen Peptiden in der Gasphase mithilfe von Infrarotspektroskopie bestimmt werden.^[12–18] In diesem Verfahren wird ein „Fingerabdruck“ von Schwingungsübergängen (Frequenzen, Intensitäten und spektrale Linienbreiten) gemessen, der dann als Referenz für die Strukturberechnungen dient. Die eindeutige Identifizierung von berechneten Strukturen eines großen Moleküls erfordert hochgenaue Fingerabdrücke für jede einzelne der beobachteten Konformationen, wie sie auch von der Theorie berechnet werden. Das wiederum bedingt eine Auflösung der Schwingungsübergänge und Konformationsselektivität in den IR-Spektren, die für große Moleküle bei Raumtemperatur eine große Herausforderung darstellt.

In den Berechnungen wird typischerweise die klassische Moleküldynamik (MD) zur Erkundung eines großen Konformationsraumes und die Identifizierung von Strukturkandidaten verwendet. Eine Auswahl der energetisch günstigsten Strukturen wird anschließend mithilfe von Ab-initio-Methoden optimiert, um die energetisch stabilste Konformation zu bestimmen. Die größte Herausforderung in diesen Rechnungen ist die in der Praxis unumgängliche Einschränkung der Konformationssuche unter den Tausenden durch die MD identifizierten Kandidaten, bevor deren Geometrien mithilfe genauerer Methoden optimiert und ihre Spektren berechnet werden können.

Unser Experiment kombiniert Elektrospray-Ionisierung, Massenspektrometrie, Tieftemperaturkühlung und Laserspektroskopie (siehe die Hintergrundinformationen für Details).^[19] Durch das Abkühlen der Probenmoleküle auf genügend tiefe Temperaturen (ca. 10 K) können die Schwingungsübergänge in den UV- und IR-Spektren von GS aufgelöst werden.^[20] Die hohe Auflösung im UV-Spektrum ermöglicht die Anwendung von IR-UV-Doppelresonanz-

[*] N. S. Nagornova, Prof. T. R. Rizzo, Dr. O. V. Boyarkin
Laboratoire de Chimie Physique Moléculaire
École Polytechnique Fédérale de Lausanne
1015 Lausanne (Schweiz)
Fax: (+41) 21-693-5170
E-Mail: oleg.boiarkin@epfl.ch
Homepage: <http://lcpm.epfl.ch/>

Dr. M. Guglielmi, M. Doemer, Dr. I. Tavernelli, Prof. U. Rothlisberger
Laboratoire de Chimie et Biochimie Computationnelle
École Polytechnique Fédérale de Lausanne
1015 Lausanne (Schweiz)

[**] Wir danken der EPFL und dem FNS (Antrag 200020-120065) für die Unterstützung dieser Arbeit, Valenta Pharm Co. (Moskau) für die Bereitstellung der Proben von GS. O.B. dankt Irina Boyarkine für ihre lebenslange Unterstützung seiner Forschung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201100702> zu finden.

messungen^[12,13,21–23] für die konformationsselektive Bestimmung der IR-Spektren.

Kürzlich haben wir eine Anwendung dieses Prinzips für die Spektroskopie von GS im 6- μm -Bereich demonstriert.^[20] Hier weiten wir diese Studien über einen signifikanten Spektralbereich aus, der alle Streckschwingungen der leichten Atome umfasst, und verwenden spezielle Methoden wie die ^{15}N -Isotopensubstitution und Komplexierung des Peptids mit einem Kronenether, um alle Schwingungsbanden zuzuordnen. Die von unseren spektroskopischen und massenspektrometrischen Daten abgeleiteten Struktureigenschaften wurden anschließend in der computergestützten Suche nach der stabilsten Struktur von isoliertem zweifach protoniertem GS genutzt. Der Vergleich der hochaufgelösten, konformationsspezifischen IR-Spektren mit den Berechnungen ermöglichte die eindeutige Zuordnung einer der Strukturkandidaten zu der in unseren Gasphasenmessungen von GS dominierend vorliegenden Konformation.

In der Gasphase und bei tiefen Temperaturen liegt $[\text{GS} + 2\text{H}]^{2+}$ in drei unterschiedlichen Konformationen vor, wobei eine davon signifikant häufiger besetzt wird als die beiden anderen.^[20] Abbildung 1a zeigt ein IR-Spektrum der häufigsten Konformation bei ca. 12 K, gemessen durch photo-

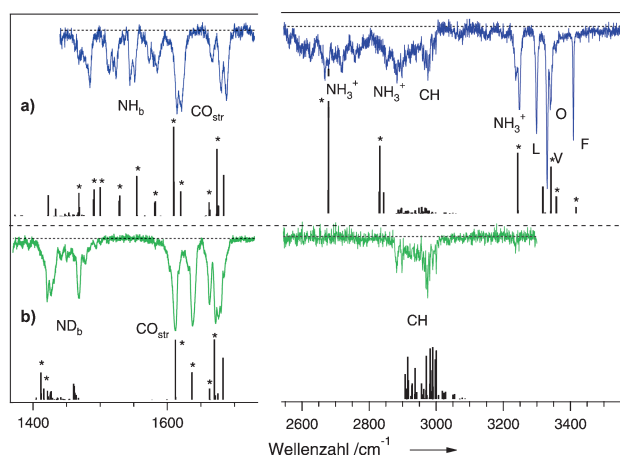


Abbildung 1. Vergleich des Infrarotspektrums der häufigsten Konformation von a) $[\text{GS} + 2\text{H}]^{2+}$ und b) seines deuterierten Analogons ($\text{N-D} \leftrightarrow \text{N-H}$), gemessen durch IR/UV-Doppelresonanz-Photofragment-Spektroskopie, mit den berechneten Schwingungsfrequenzen der stabilsten Struktur der jeweiligen Spezies (Balken). Die berechneten Frequenzen wurden in (a) mit einem Faktor von 0.961 und in (b) mit einem Faktor von 0.941 skaliert. Zusätzlich wurden die Frequenzen der NH/CH -Streckschwingungen in (a) um den Term $\Delta\nu_i = -20\sqrt{\delta\nu_i}$ verschoben, wobei $\delta\nu_i$ die Breite des i -ten Signals ist. Sterne markieren Übergänge mit hoher Oszillatorstärke.

fragmentdetektierte IR-UV-Doppelresonanz. Das Spektrum, das die NH -, CH - und C=O -Streck- sowie die NH -Beugungsschwingungen abdeckt, stellt einen Satz von beinahe 30 spektroskopischen Referenzschwingungen dar, die für die eindeutige Zuweisung einer 3D-Struktur von zweifach protoniertem GS aus den berechneten Möglichkeiten verwendet werden kann. In mehreren Bereichen des Spektrums stellen die nahe beieinander befindlichen Signale hohe Anforder-

ungen an die Genauigkeit der berechneten Schwingungsfrequenzen. Zudem ist eine einfache Übereinstimmung von berechneten und gemessenen Frequenzen zur eindeutigen Identifizierung der experimentell vorliegenden Struktur nicht ausreichend. Die korrekte Zuweisung der Signale zu spezifischen Schwingungsmoden stellt die eigentliche Verbindung zwischen Experiment und Theorie dar.

Wir haben verschiedene Methoden zur Zuordnung der Schwingungsbanden in Abbildung 1a genutzt. Eine Isotopenmarkierung der zwei Val- und zwei Leu-Reste durch ^{15}N sollte die beiden Amid- NH -Streckschwingungen um ca. 8 cm^{-1} (in der harmonischen Näherung) nach tieferen Frequenzen verschieben. Im IR-Spektrum in Abbildung 2b ist

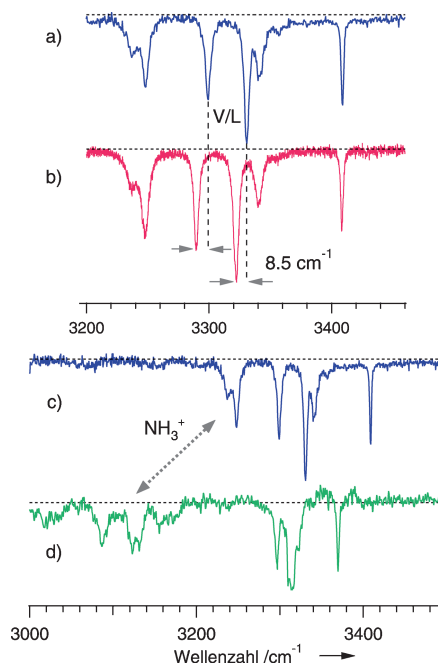


Abbildung 2. Ausschnitte der IR-Spektren der häufigsten Konformation von a,c) $[\text{GS} + 2\text{H}]^{2+}$, b) seinem Isotopologen ($^{15}\text{N} \leftarrow ^{14}\text{N}$ in Leu und Val) und c) dem $[\text{GS} + 2\text{H}]^{2+} \cdot ([18]\text{Krone-6})$ -Komplex.

tatsächlich eine Verschiebung von -8.5 cm^{-1} zweier Signale des isotope-markierten Moleküls sichtbar, was uns die eindeutige Zuordnung dieser Signale zu den vier NH -Streckschwingungen dieser Aminosäuren erlaubt. Die Tatsache, dass die Isotopenmarkierung der vier Aminosäuren nur zwei Signale verschiebt, legt den Schluss nahe, dass die NH -Streckschwingungen jedes Paares identischer Aminosäuren der symmetrischen Sequenz beinahe entartete Frequenzen haben und infolgedessen die gleichen symmetrisch äquivalenten Positionen einnehmen. Diese Beobachtung stützt unsere frühere Vermutung einer hoch symmetrischen (C_2) Struktur von $[\text{GS} + 2\text{H}]^{2+}$.^[20] In einem weiteren Ansatz wurden sämtliche Amid-Wasserstoffatome durch Deuterium substituiert, wobei alle ND -Streckschwingungen auf Werte unter 2500 cm^{-1} verschoben werden, sodass für eine erleichterte Bandenzuordnung nur die CH -Streckschwingungen in der Region von $3\text{ }\mu\text{m}$ verbleiben (Abbildung 1b). Das Verschieben der ND -Beugungsschwingungen hin zu niedrigeren

Wellenzahlen erlaubt außerdem die Unterscheidung zwischen Amid-Beugungsschwingungen und C=O-Streckschwingungen.

Wir ordnen die beiden Signale um 3240 cm^{-1} den NH_3^+ -Streckschwingungen zu, der allgemeinen Erwartung folgend, dass die Frequenzen geladener Gruppen durch stärkere Wasserstoffbrücken im Vergleich zu den Amid-NH-Streckschwingungen deutlich hin zu niedrigerer Energie verschoben werden. Diese Zuordnung wurde durch die Komplexierung von $[\text{GS} + 2\text{H}]^{2+}$ mit zwei Kronenethern ([18]Krone-6), die besonders starke Wasserstoffbrücken mit NH_3^+ -Gruppen bilden, bestätigt.^[24,25] Wie in Abbildung 2c und d ersichtlich ist, führt die Komplexierung zu einer zusätzlichen Verschiebung dieser zwei Signale um $120\text{--}150\text{ cm}^{-1}$.

Dem UV-induzierten Photofragment-Massenspektrum von $[\text{GS} + 2\text{H}]^{2+}$ (Abbildung H1 in den Hintergrundinformationen) können zusätzliche Informationen entnommen werden, die unsere Suche nach passenden Strukturen für die Berechnung des IR-Spektrums einschränken. Die zwei häufigsten Fragmente, die aus der Photoanregung der Phe-Chromophore entstehen, entsprechen dem Verlust der neutralen Fragmente $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ und $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ der Ornithin-Seitenketten, obwohl diese Kanäle bei stoßinduzierter Dissoziation^[7] und Infrarot-Multiphotonendissoziation (IRMPD; Abbildung H1) vernachlässigbar sind. Die beobachtete nicht-statistische Dissoziation^[26] lässt einen anfänglichen Transfer von Photoanregungsenergie direkt von den Phe-Chromophoren auf die Amine der Orn-Seitenketten vermuten und impliziert eine gewisse Nähe und Kopplung zwischen den beiden Gruppen. Diese Schlussfolgerung, zusammen mit der vom IR-Spektrum abgeleiteten Symmetrie, schränkt die Konformationsuche nach passenden Strukturkandidaten drastisch ein.

Für eine effiziente Erkundung des Konformationsraumes wurden MD-Simulationen in Kombination mit einer minimalen Zahl von Nebenbedingungen zur Erfüllung der experimentell abgeleiteten strukturellen Randbedingungen verwendet. Ein anfänglicher Satz von Strukturkandidaten wurde auf diese Weise mithilfe von mehreren Simulated-Annealing-Läufen erzeugt, in denen das System zur effizienteren Erkundung des Phasenraums auf hohe Temperaturen (1500 K) aufgeheizt und anschließend langsam abgekühlt wurde. Aus diesen Konformationssuchen wurden die vier energetisch stabilsten Strukturen mithilfe von Dichtefunktionaltheorie optimiert und ihre harmonischen Schwingungsfrequenzen berechnet (siehe Hintergrundinformationen für Details zu den Rechnungen). Nach Skalierung zur Berücksichtigung von Schwingungsanharmonien stimmen die Frequenzen der stabilsten Struktur (Tabelle H2), gut mit dem gemessenen IR-Spektrum der Hauptkonformation überein (Abbildung H2). Die Zuordnungen aller berechneten Schwingungsbanden entsprechen ausnahmslos unseren experimentell bestimmten Zuordnungen. Nur die Ammonium-NH-Streckschwingungsfrequenzen werden von den Berechnungen nicht gut vorhergesagt. Allerdings erwarten wir auch keine exakte Beschreibung dieser stark gekoppelten Banden, da Anharmonieeffekte hier größer sind als für die schwach gekoppelten NH/CH-Streckschwingungen. Eine Verfeinerung der beiden Skalierungskoeffizienten, die in der Physik intramolekularer

Schwingungskopplungen begründet ist (siehe Hintergrundinformationen), erzielt eine deutlich bessere Übereinstimmung der berechneten mit den gemessenen Frequenzen.

Ein strikter Test für die Richtigkeit der berechneten energetisch stabilsten Struktur ist die Berechnung des Schwingungsspektrums des deuterierten Peptids. Eine Deuterierung ändert nicht die Struktur, verschiebt jedoch die NH-Streckschwingungsbanden nach niedrigeren Frequenzen. Das berechnete Spektrum der deuterierten Spezies stimmt gut mit den experimentellen Daten überein (Abbildung 1b), was unser Vertrauen in die Korrektheit der berechneten Struktur bestärkt.

In Abbildung 3 wird die hier bestimmte Struktur von isoliertem $[\text{GS} + 2\text{H}]^{2+}$ mit der durch Röntgenbeugung gemessenen Kristallstruktur^[8] der hydratisierten Spezies ver-

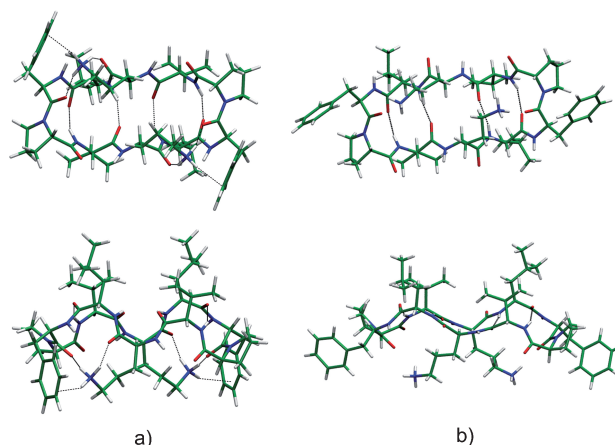


Abbildung 3. Zwei 3D-Ansichten der Strukturen von $[\text{GS} + 2\text{H}]^{2+}$: a) Gasphasenstruktur, bestimmt durch kalte Ionenspektroskopie für die energetisch stabilste Konformation der isolierten Spezies (diese Arbeit). b) Struktur im Festkörper, bestimmt durch Röntgenbeugung am Kristall (Rekonstruktion nach den Daten in Lit. [8]).

glichen. Die beinahe symmetrische (C_2) Struktur des isolierten Peptids erscheint um 40 % weniger gedehnt und kompakter. Sie weist eine charakteristische parallele Ausrichtung der zwei Phe-Ringe auf, die sich beide jeweils in der Nähe einer NH_3^+ -Gruppe der Orn-Seitenketten befinden. Dieser Unterschied in der Struktur stammt größtenteils von der Solvation der geladenen Orn-Seitenketten im Kristall, welche die Bildung der Kation- π -Wasserstoffbrücken mit den Phe-Ringen verhindert. In der isolierten Struktur bilden die NH_3^+ -Gruppen außerdem auch Wasserstoffbrücken mit den Carbonyl-Sauerstoffatomen der Phe- und Orn-Reste, durch die sie am Peptidrückgrat fixiert werden. Tabelle H3 enthält die Koordinaten der berechneten Struktur.

Wir haben gezeigt, wie durch kalte Ionenspektroskopie in Kombination mit hochgenauen Rechenverfahren die konformationsselektiven Strukturen von isolierten mittelgroßen Peptiden bestimmt werden können. Obwohl isolierte Strukturen nicht zwingend den In-vivo-Strukturen entsprechen, sollten sie doch hilfreich zum Verständnis der In-vivo-Wechselwirkungen sein. Zum Beispiel kann die Struktur von Gramicidin S in Wechselwirkung mit einer Membran von der

in vitro durch NMR-Spektroskopie oder Röntgenbeugung bestimmten Struktur abweichen, was die intrinsische Struktur, wie sie hier bestimmt wurde, zu einem wertvollen Startpunkt für die Modellierung der In-vivo-Aktivität dieses Antibiotikums macht. Nach unserer Kenntnis ist Gramacidin S das bisher größte Molekül, dessen genaue intrinsische Struktur bestimmt worden ist.

Eingegangen am 27. Januar 2011,
veränderte Fassung am 7. März 2011
Online veröffentlicht am 6. Mai 2011

Stichwörter: Gramacidin S · Kalte Ionenspektroskopie · Molecular Modeling · Peptide · Strukturaufklärung

- [1] G. F. Gause, M. G. Brazhnikova, *Nature* **1944**, 154, 703.
- [2] D. T. Warner, *Nature* **1961**, 190, 120.
- [3] S. E. Hull, R. Karlsson, P. Main, M. M. Woolfson, E. J. Dodson, *Nature* **1978**, 275, 206.
- [4] Y. Xu, I. Sugár, N. Krishna, *J. Biomol. NMR* **1995**, 5, 37.
- [5] G. N. Tishchenko, V. I. Andrianov, B. K. Vainstein, M. M. Woolfson, E. Dodson, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1997**, 53, 151.
- [6] E. J. Prenner, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1999**, 1462, 201.
- [7] E. Pittenauer, M. Zehl, O. Belgacem, E. Raptakis, R. Mistrik, G. Allmaier, *J. Mass Spectrom.* **2006**, 41, 421.
- [8] A. L. Llamas-Saiz, G. M. Grotenbreg, M. Overhand, M. J. van Raaij, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2007**, 63, 401.
- [9] G. von Helden, T. Wyttenbach, M. T. Bowers, *Science* **1995**, 267, 1483.
- [10] K. B. Shelimov, D. E. Clemmer, R. R. Hudgins, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2240.
- [11] R. R. Hudgins, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3494.
- [12] J. R. Carney, T. S. Zwier, *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 8677.
- [13] L. C. Snoek, E. G. Robertson, R. T. Kroemer, J. P. Simons, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, 321, 49.
- [14] C. Unterberg, A. Jansen, M. Gerhards, *J. Chem. Phys.* **2000**, 113, 7945.
- [15] W. Chin, F. Piuzzi, J. P. Dognon, I. Dimicoli, B. Tardivel, M. Mons, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11900.
- [16] M. S. de Vries, P. Hobza, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, 58, 585.
- [17] J. A. Stearns, O. V. Boyarkin, T. R. Rizzo, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 13820.
- [18] T. R. Rizzo, J. A. Stearns, O. V. Boyarkin, *Int. Rev. Phys. Chem.* **2009**, 28, 481.
- [19] O. V. Boyarkin, S. R. Mercier, A. Kamariotis, T. R. Rizzo, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2816.
- [20] N. S. Nagornova, T. R. Rizzo, O. V. Boyarkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 4040.
- [21] R. H. Page, Y. R. Shen, Y. T. Lee, *J. Chem. Phys.* **1988**, 88, 5362.
- [22] C. J. Gruenloh, J. R. Carney, F. C. Hagemeister, C. A. Arrington, T. S. Zwier, S. Y. Fredericks, J. T. Wood, K. D. Jordan, *J. Chem. Phys.* **1998**, 109, 6601.
- [23] C. Plützer, E. Nir, M. S. de Vries, K. Kleinerhanns, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, 3, 5466.
- [24] J. S. Brodbelt, *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, 200, 57.
- [25] R. R. Julian, J. L. Beauchamp, *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, 210/211, 613.
- [26] M. Guidi, U. J. Lorenz, G. Papadopoulos, O. V. Boyarkin, T. R. Rizzo, *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 797.