

Synthese und Konformation regelmäßiger Copolymerer von Alanin und Glycin (Modellsubstanzen zum Studium der Seiden)

Von

A. Brack, Anita Caille und G. Spach*

Aus dem Centre de Biophysique Moléculaire, C.N.R.S.,
Avenue de la Recherche Scientifique, F-45 Orléans-02, France

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 10. Februar 1972)

*Synthesis and Conformation of Periodic Copolymers of Alanine
and Glycine. Models for Silk Studies*

Polypeptides of the type $(Ala_x-Gly_y)_n$ with a periodic distribution of L-alanyl and glycylic residues i.e. $poly(Ala-Gly)$, $poly(Ala-Gly_2)$, $poly(Ala-Gly_3)$, $poly(Ala_2-Gly)$, $poly(Ala_2-Gly_2)$, $poly(Ala_2-Gly_3)$, and $poly(Ala_3-Gly_3)$ were synthesized by polymerization of the corresponding peptide pentachlorophenyl ester in benzene. Depending on the work up the ensuing polypeptides may exist in the solid state under two different conformations characterized by I.R.-spectroscopy, circular dichroism and X-ray diffraction. All exhibit the β structure. In addition of this, when x is different from y , the polymer assumes the usual conformation of the residue which is predominant. For instance, we show that $poly(Ala-Gly_2)$ and $poly(Ala-Gly_3)$ possess a polyglycine II type structure. If $x = y = 1$, the polymer shows a particular structure characterized by a dipeptide conformational unit resembling the water soluble form of silk from *Bombyx mori*. These results show the interest of synthetic periodic polypeptides as models for fibrous proteins like silks.

Die Bereitung und die Charakterisierung der ersten Elemente der Folge $(Ala_x-Gly_y)_n$ wird für $x = 1$ oder 2 , $y = 1$, 2 oder 3 , und $x = 3$, $y = 3$, beschrieben. Das spektroskopische und kristallographische Studium dieser Polymeren im festen Zustand beweist, daß sie in zwei kristallinen Formen vorliegen können; sie haben durchwegs β -Konformation. Wenn x verschieden von y ist, nimmt das Polymere — mit Ausnahme von $(Ala_2-Gly_3)_n$ — die gewöhnliche Konformation des Restes, der im Überschuß ist, an. Zum Beispiel haben wir für

* Herrn Prof. Dr. O. Kratky zum 70. Geburtstag gewidmet.

$(Ala-Gly_2)_n$ und $(Ala-Gly_3)_n$ die Existenz einer Konformation bewiesen, die der II-Form der Polyglycine nahekommt. Wenn $x = y = 1$, bildet das Polymere eine besondere Form, deren konformationelle Periode die peptidische Einheit ist, und die große Ähnlichkeiten mit der löslichen Form der Seide vom *Bombyx Mori* zeigt. Diese Ergebnisse illustrieren das Interesse, das den synthetischen Polypeptiden als Modellen für das Studium der Faserproteine, wie der Seiden, zukommt.

Obwohl die Seiden bei den Biologen weit geringeres Interesse erregt haben als die Proteine, welche an den fundamentalen Lebensvorgängen beteiligt sind, haben sich diese Peptide als sehr wertvoll erwiesen für das Studium von Polypeptidketten, da synthetische Modellsubstanzen fehlten.

Das Fibroin der Seide von *Bombyx Mori* (Seidenspinner) hat wegen seines besonders einfachen und regelmäßigen chemischen Baues lange Zeit das Interesse der Forscher beschäftigt. So haben die Röntgen-Strukturstudien von *Kratky* und seiner Schule^{1, 2} maßgeblich den Weg erschlossen, welcher *Marsh* und Mitarb.^{3, 4} dazu führen sollte, auf die β -Struktur der Polypeptide zu schließen, insbesondere eine Struktur aus Plättchen aus antiparallel gefalteten Ketten. *Kratky* hat auch gezeigt, daß dieses Fibroin in einer zweiten kristallinen Form erhalten werden kann, die er als Form I bezeichnet^{5, 6}, und in einer amorphen Form⁷.

Vor einiger Zeit haben *Lucas* und *Rudall*⁸ einen Überblick über die eindrucksvolle Vielfalt der verschiedenen Konformationen gegeben, die man bei den Seiden gefunden hat: helicoidale oder superhelicoidale, gestreckte Ketten vom β - oder „cross- β “-Typ, Konformationen vom Collagentyp oder Polyglycintyp II. Es scheint, daß die Existenz dieser Typen in direktem Zusammenhang mit der Art und Abfolge der Aminosäuren steht. Unter diesen sind in der Mehrzahl der Seiden Alanin und Glycin am häufigsten: sie können bis zu 95% (*Anaphe Moloneyi*) der gesamten Aminosäuren ausmachen. Das Mengenverhältnis zwischen diesen beiden Aminosäuren erstreckt sich von etwa 2 : 1 (bei *Anaphe infracta*) bis zu 1 : 2 (*Zygaena filipendula*). Ein interessanter Fall liegt bei *Phymatocera aterrima* vor, die zu zwei Dritteln aus Glycin aufgebaut ist, während der Rest auf über zehn mehr oder weniger raumbanspruchende Aminosäuren entfällt, die eine Polyglycin-II-Konformation annehmen.

Die Synthese von regelmäßigen Copolymeren des Glycins und des Alanins und das Studium ihrer Konformationen kann daher auf diesem Gebiet neue Erkenntnisse bringen. Wir fassen in der vorliegenden Mitteilung Befunde, von denen einige schon veröffentlicht wurden, zusammen und versuchen zu zeigen, inwieweit sie zum Verständnis der Struktur der Seiden beitragen.

Synthese der Copolymeren

Zur Gewinnung der Copolymeren haben wir die Pentachlorphenylester der Peptide $H-(Ala_x-Gly_y)-OH$ ⁹ der Polykondensation unterworfen. Diese Derivate kristallisieren gut, und sie können für eine nochmalige Synthese verwendet werden. Ihr Hauptnachteil ist ihre Empfindlichkeit gegen Basen, z. B. Triäthylamin, das benutzt wird, um die Polykondensation zu bewirken: sie führt zur Racemisation an dem Kohlenstoffatom, welches die Esterfunktion trägt. Dies ist der Grund, warum wir immer mit Peptiden arbeiteten, welche Glycin als C-terminale Gruppe haben.

Die reaktiven Ester der Peptide wurden auf mehreren Wegen hergestellt, die im Schema zusammengestellt sind. Die Methode I kann verwendet werden, wenn das freie Peptid oder ein am N geschütztes Derivat zur Verfügung steht. Die Methoden II und III erlauben die Herstellung von Serien von Polymeren mit konstantem y , weil ein Teil des Bromhydrats des Ala_x-Gly_y -Pentachlorphenylesters (im Schema punktiert) in den Prozeß zurückkehrt, womit x um eine Einheit größer wird. Methode III war es, die uns am meisten befriedigte, indem sie im Verlauf der ersten Stufe die besten Ausbeuten lieferte.

Zur Durchführung der Polymerisation fügten wir 2,5 Äquivalente Triäthylamin zu einer Suspension des Hydrochlorids oder Hydrobromids des reaktiven Peptidesters in Benzol. Wir haben dieses leicht zu reinigende Lösungsmittel gewählt, obwohl die Polymeren, welche sich bilden, darin völlig unlöslich sind. Die Erfahrung zeigt, daß man unter diesen Bedingungen beachtliche Molekulargewichte erzielen kann. Proben, die in wäßr. 60proz. LiBr-Lösung dialysiert wurden, wurden durch ihre reduzierten Viskositäten (η/c ; $c = 1$ g in 100 ml) in Dichloressigsäure charakterisiert. Diese lagen in der Größenordnung 40—60 ml g⁻¹. Das Molekulargewicht einer Probe, durch Lichtdiffusion gemessen, lag bei 14 000, was einem mittleren Wert von 230 Aminosäureresten entspricht. Das molare optische Drehvermögen lag im gleichen Lösungsmittel bei -110° pro Alanylrest in allen Proben, ausgenommen in $(Ala_2-Gly)_n$, das eine teilweise helicoidale Struktur besitzt⁹. Keines der Polymeren ist wasserlöslich, sie lösen sich aber in mehr oder weniger konzentrierter LiBr-Lösung und in den Halogenwasserstoffsäuren.

Herstellung verschiedener Kristallformen

Sowohl Polyalanin als auch Polyglycin existieren in einer β -Form in gefalteten Blättchen von antiparallelen Ketten. Von diesen beiden Homopolymeren ist nur das Polyalanin außerdem in einer helicoidalen α -Form bekannt, während nur das Polyglycin eine besondere Konformation, die sogen. Form II, annehmen kann. Wir haben daher Untersuchungen angestellt, ob etwa diese Konformationen bei den Copolymeren $(Ala_x-Gly_y)_n$ existenzfähig sind⁹.

Zu diesem Zweck haben wir die Proben Bedingungen unterworfen, von denen bekannt ist, daß sie die eine oder die andere dieser Formen liefern. Um die α -Struktur zu erhalten, haben wir die Proben in einer Mischung gleicher Volumina CHCl_3 und CF_3COOH gelöst und durch Verdunsten an der Luft als Filme isoliert. Um die Struktur II zu erhalten, kann man das Polymere aus seinen Lösungen durch Wasserzusatz ausfällen oder eine wäßrige Polymer/LiBr-Lösung gegen immer verdünntere LiBr-Lösungen dialysieren.

Die β -Form stellt man her, indem man eine Lösung des Polymeren in Dichloressigsäure entweder in Äthanol eingießt oder einfach das Lösungsmittel abdampft.

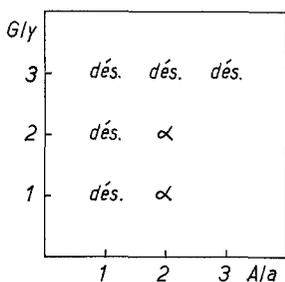


Abb. 1

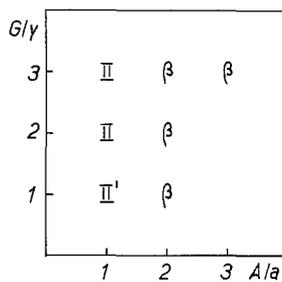


Abb. 2

Abb. 1. Strukturen, die durch Verdampfen der Mischung Trifluoressigsäure—Chloroform auf Quarz erhalten wurden. *des.* ist die ungeordnete Form, die durch ihr CD-Spektrum charakterisiert wurde

Abb. 2. Strukturen, die durch Fällung einer Lösung in 60proz. LiBr mit Wasser erhalten wurden

Als Charakterisierungstechnik haben wir im wesentlichen bei Filmen die IR-Spektroskopie angewendet, bei Pulvern die Röntgenographie und bei wäßrigen Suspensionen den Circular dichroismus.

Beschreibung der Konformationen

In den Abb. 1 und 2 haben wir die Konformation jeder Probe von $(\text{Ala}_x\text{—Gly}_y)_n$ symbolisch gegen die stöchiometrischen Indices x (Abszisse) und y (Ordinate) eingetragen. Abb. 1 gibt dabei die Strukturen an, die wir erhielten, wenn wir die zur Herstellung der α -Struktur geeigneten Methoden anwendeten. Abb. 2 die Strukturen, welche bei Versuchen zur Herstellung der Form II tatsächlich auftraten.

Nicht- β -Formen

Man sieht, daß die Copolymeren, die mehr Glycin als Alanin enthalten, also $(\text{Ala—Gly}_2)_n$, $(\text{Ala—Gly}_3)_n$, jedoch nicht $(\text{Ala}_2\text{—Gly}_3)_n$, die

Konformation II annehmen können, aber nicht in einer helicoidalen Form erhalten werden können.

Dieser Befund ist interessant, weil er zeigt, daß es nicht unbedingt notwendig ist, lange Glycinsequenzen zu haben, um eine solche Konformation, wie man sie in gewissen Seiden vorfindet⁸, zu haben.

Eine kristallographische Untersuchung der beiden Copolymeren in Form II haben *Lotz* und *Keith*¹¹ durchgeführt. Diese Autoren haben gezeigt, daß die 3_1 -Helices links-gewunden sind und daß sie im Falle des $(Ala-Gly)_n$ Doppelschichten bilden, zwischen denen Wassermoleküle angeordnet seien.

Wir versuchten zu ermitteln, ob diese Struktur voluminösere Gruppen als das Alanin einbauen kann. Das Copolymere $(Leu-Gly)_n$ wurde unter Verwendung des 1-Succinimid-derivates nach Methode II hergestellt¹². Das erhaltene Polymere ($\eta_{sp}/c = 23,0 \text{ ml g}^{-1}$, $[\alpha]_D^{20} = +23,4^\circ$, $c = 1$ in Dichloressigsäure) ist unlöslich in 60proz. wäßr. LiBr-Lösung. Fällt man es aus seiner Lösung in Dichloressigsäure mit Wasser aus, gibt es ein Produkt, dessen IR-Spektrum (breite Amid-I-Bande bei 1655 cm^{-1}), dessen Pulverdiagramm (schwache Linien, die den Abständen $8,83$ und $5,58 \text{ \AA}$ entsprechen, starke entspr. $4,40$ und $3,95 \text{ \AA}$) und dessen Circular dichroismus einer wäßrigen Suspension (positive Bande um 225 nm , negative um 205 nm) nicht gegen eine Typ-II-Polyglycin-Struktur sprachen, in der Wasser eine wichtige Rolle spielen müßte.

Das alaninreiche Copolymere $(Ala_2-Gly)_n$ kann in Form der α -Helix erhalten werden.

Die Copolymeren, welche gleich viel Alanin und Glycin enthalten, verhalten sich verschieden. Am interessantesten ist der Fall $(Ala-Gly)_n$. Sein IR-Spektrum weist Analogien mit dem des Typs II auf, aber sein Circular dichroismus ist mit keinem anderen Spektrum vergleichbar. Ebenso sind die Abmessungen der Elementarzelle weder mit der α - noch mit der β - oder der Typ-II-Struktur verträglich. Wir hatten eine Struktur vorgeschlagen¹³, in der die Alaninreste eine besondere Konformation annehmen und die Glycinreste wieder eine andere, indem z. B. die Winkel φ und ψ für den Alaninrest Werte aufweisen, die denen der α -Struktur nahekommen (-57° und -47°), und für das Glycin solche, die der β -Struktur ähneln (-140° und $+135^\circ$). Wir hatten auch die von *Venkatachalam*¹⁵ für die Dipeptideinheit $(Ala-Gly)$ vorgeschlagenen Konformationen in Betracht gezogen, unter welchen am leichtesten mit Modellen zu konstruieren ist eine Form II', bei der für das Alanin die Winkel φ und ψ um -80° bzw. 0° , für das Glycin $+60^\circ$ und -130° charakteristisch sind sowie abwechselnd inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken. Tatsächlich hat aber das eingehende Studium dieses Polymeren durch Elektronenbrechung *Lotz* und *Keith*¹⁶ dazu geführt, daß sie eine Struktur aufstellten, in der die Konformationswinkel des

Alanylrestes denen einer β -Struktur nahekommen (-123° und $+122^\circ$), während die des Glycyls ($\pm 57^\circ$ und $\pm 72^\circ$) denen einer rechts- oder linksgewendelten α -Helix ähnlich sind. Dieses Ergebnis ist überraschend, weil das Polyglycin nicht in einer α -Form bekannt ist und weil der Glycylrest in Copolypeptiden, soweit bisher bekannt, diese Konformation nur in Gegenwart von Resten, die selber helicoid gebaut sind, annimmt. Diese neue Polypeptidform, in Abb. 2 als II' bezeichnet, ist, wie Lotz und Keith¹⁶ betonen, ein Modell der instabilen (der sogen. löslichen) Form des Fibroins der Seide von Bombyx mori, welche Kratky und Mitarb.⁵ beschreiben.

Die anderen Copolymeren, bei denen $x = y$, bieten nicht so viel Interesse, um so weniger als analoge Sequenzen in den Seiden nicht

Tabelle 1. Wichtigste Röntgenlinien der β -Strukturen der Copolymeren $(Ala_x-Gly_y)_n$ im Vergleich mit denen des Polyglycins und des Polyalanins
TF = sehr stark, F = stark M = mittel

G_n	d_{hkl}	4,36	3,44			
	I_0	M	F			
$(AG_3)_n$	d_{hkl}	4,29	3,95			
	I_0	TF	M			
$(AG_2)_n$	d_{hkl}	4,30	4,18	3,65		
	I_0	M	F	M		
$(A_2G_3)_n$	d_{hkl}	5,07	4,29	3,81	3,37	
	I_0	TF	TF	M	M	
$(AG)_n$	d_{hkl}	4,48	4,23	3,63		
	I_0	TF	F	M		
$(A_2G_2)_n$	d_{hkl}	5,15	4,85	4,25	3,85	3,23
	I_0	TF	M	TF	M	M
$(A_2G)_n$	d_{hkl}	5,07	4,29	3,75		
	I_0	TF	TF	F		
$(A_2G)_n$	d_{hkl}	5,02	4,30	3,71		
	I_0	TF	F	M		
A_n^*	d_{hkl}	5,35	4,37	3,73		
	I_0	TF	F	M		

* C. H. Bamford, A. Elliott und W. E. Hanby, Synthetic Polypeptides, S. 288. New York: Academic Press. 1956.

gefunden wurden. Halten wir fest, daß wir bei $(Ala_2-Gly_2)_n$ nur die α - oder β -Struktur gefunden haben, die β -Form und eine ungeordnete Struktur beim $(Ala_3-Gly_3)_n$.

Wir haben unsere Studien nicht auf die höheren Glieder der Copolymerenserie $(Ala_x-Gly_y)_n$ ausgedehnt. Es ist wahrscheinlich, daß — wenn x und y große Werte annehmen — jede Sequenz die ihr gemäße Konformation annimmt und daß man Mischstrukturen finden wird.

β -Strukturen

Alle unsere Copolymeren nehmen leicht eine β -Form an. Wie bei der des Polyglycins und des Polyalanins¹⁷ handelt es sich um gefaltete Blättchen von antiparallelen Ketten, wie dies das Studium des IR-Absorptionsspektren nahelegt, die eine charakteristische Schulter bei $1690-1695\text{ cm}^{-1}$ zeigen. Indessen muß die unregelmäßige Abfolge der Reste — außer bei $(Ala-Gly)_n$ — zu Deformationen führen. In der Tabelle sind die Abstände der stärksten Linien der Pulverdiagramme, welche diese Polymeren liefern, zusammengestellt. Die detaillierte Untersuchung dieser Strukturen ist noch nicht abgeschlossen.

Schlußwort

Das Studium der Konformation der Seiden hat, nachdem es zweifellos seit 1955 ein wenig vernachlässigt wurde, wieder an Interesse gewonnen, weil dank der Fortschritte, welche die Peptidchemie gemacht hat, die Fraktionierung von Proteinen, die Aufklärung der Sequenzen und die Synthese komplexer Modelle erleichtert wurden.

Die regelmäßigen Copolymeren des Alanins und des Glycins, die wir untersucht haben, erwiesen sich — mindestens einige — als nützliche Modelle für das Studium der Seiden. Sicherlich müssen auf diesem Gebiet noch weitere Fortschritte gemacht werden, z. B. Einbau anderer Aminosäuren, wie von Tyrosin, in größerem Abstand, die möglicherweise zusammenhängen mit der Faltung der Polypeptidketten und der Bildung von Fibrinteilchen. Andererseits sind noch einfache Fälle zu untersuchen, wie $(Ala-Gln)_n$, Modelle für die Seiden gewisser Glieder der Argidae-Familie.

Danksagung

Wir danken Herrn Prof. *Charles Sadron*, Direktor des Centre de Biophysique Moléculaire, für das große Interesse, das er dauernd an der vorliegenden Untersuchung genommen hat.

Literatur

- ¹ O. Kratky, Z. physik. Chem. **B 5**, 297 (1929).
- ² O. Kratky und S. Kuriyama, Z. physik. Chem. **B 11**, 363 (1931).
- ³ R. E. Marsh, R. B. Corey und L. Pauling, Biochim. Biophys. Acta **16**, 1 (1955).
- ⁴ R. E. Marsh, R. B. Corey und L. Pauling, Acta Cryst. **8**, 720 (1955).
- ⁵ O. Kratky, E. Schauenstein und A. Sekora, Nature **165**, 319, 527 (1950).
- ⁶ O. Kratky und E. Schauenstein, Discuss. Faraday Soc. **11**, 171 (1951).
- ⁷ O. Kratky, Trans. Faraday Soc. **52**, 558 (1956).
- ⁸ F. Lucas und K. M. Rudall, Comprehensive Biochemistry (Ed. M. Florkin und E. H. Stotz), Elsevier, Amsterdam, **23 B**, 475 (1967).
- ⁹ A. Brack und G. Spach, Biopolymers **11**, 563 (1972).
- ¹⁰ A. Brack und G. Spach, Peptides 1968, Actes du 9ème Symposium Européen sur les peptides, Orsay 1968, S. 45. Amsterdam: North Holland. 1968.
- ¹¹ B. Lotz und H. D. Keith, J. Mol. Biol. **61**, 195 (1971).
- ¹² A. Brack, unveröff. Ergebnisse.
- ¹³ A. Brack und G. Spach, C. r. hebdomad. Sé. Acad. Sci. **271 C**, 916 (1970).
- ¹⁴ B. Lotz und H. D. Keith, Meeting of the American Physical Society, Dallas, march 1970.
- ¹⁵ C. M. Venkatachalam, Biopolymers **6**, 1425 (1968).
- ¹⁶ B. Lotz und H. D. Keith, J. Mol. Biol. **61**, 201 (1971).
- ¹⁷ S. Arnott, S. D. Dover und A. Elliott, J. Mol. Biol. **30**, 201 (1967).