



Doctoral Thesis

Models of thioredoxin hairpin structures conformational properties of reverse turn containing sequences

Author(s):

Azzena, Ugo

Publication Date:

1987

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000475350> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 8445

**MODELS OF THIOREDOXIN HAIRPIN STRUCTURES: CONFORMATIONAL PROPERTIES
OF REVERSE TURN CONTAINING SEQUENCES**

A Dissertation Submitted To The
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

For The Degree Of
Doctor Of Natural Sciences

Presented By
UGO AZZENA

Dottore In Chimica From The University Of Sassari (Italy)
Born On 16th December 1954
Citizen Of Italy

Accepted On The Recommendation Of
Prof. Dr. P. L. Luisi
Prof. Dr. P. Pino

Zurich 1987

Abstract.

The Chou and Fasman and the Lifson and Sander statistical predictive methods over conformational preferences of amino acid residues have been used to design a series of peptides of general sequences $(\text{Ile})_n\text{-Gly-Pro-Gly-Gly-(Val)}_n$ with $n = 0, 1, 3,$ and 5 as synthetic analogues of the fragments (74-91) and (77-91) of the small protein thioredoxin from *E. Coli*, which, according to the x-ray structure of the uncleaved protein, contain an irregular β -hairpin structure.

The two statistical methods employed are complementary, as the first one allows predictions over the local backbone conformation of peptides and proteins including medium range sequential constraints, while the second one evidences long range interstrand interactions between residues which face each other in the β -extended conformation.

In a previous work the natural sequences (74-91) and (77-91) have been synthesized, and it has been shown, by means of CD spectroscopy, that they are not able to adopt structures characterized by an intrinsic conformational stability, both in aqueous or in organic solvents.

This fact is discussed here in terms of the above mentioned predictive approaches.

The syntheses of the smaller three members of the series, namely Tfa-Gly-Pro-Gly-Gly-OMe (**8**), BOC-Ile-Gly-Pro-Gly-Gly-Val-OMe (**11**), BOC-(Val)₃-Gly-Pro-Gly-Gly-(Ile)₃-OMe (**22**) have been achieved using conventional synthetic methods in solution.

We have used, to a large extent, the fragment condensation technique employing mostly the mixed anhydride coupling procedure, and the peptides have been characterized and shown to be pure by means of mass and ¹H-NMR spectroscopies, amino acid and elemental analyses, and thin layer chromatography in various solvent systems.

The synthesis of the higher homologue of the series ($n = 5$), has been attempted unsuccessfully using the liquid phase method of peptide synthesis, always with a fragment condensation technique.

Another peptide sequence, i.e. (Ile)₃-(Val)₃, has been designed and synthesized to gain insight on the capability of the residues of

isoleucine and valine to co-operate in the stabilization of antiparallel β -extended structures. The synthesis of this sequence has been achieved with both the synthetic methods mentioned above to give, respectively, the products BOC-(Ile)₃-(Val)₃-OMe (23) and BOC-(Ile)₃-(Val)₃-NHPEGM (30).

The conformational behaviour in solution of all the synthesized products have been investigated, both in aqueous and in organic solvents, by means of CD spectroscopy.

The results show a great influence of the chain length on the conformational behaviour of the compounds of sequence (Ile)_n-Gly-Pro-Gly-Gly-(Val)_n.

In particular, while the tetrapeptide is not able to fold in a β -turn conformation, the CD spectra of compounds 11 and 22 are indicative of intramolecular β -structures.

The most interesting case was observed for the decapeptide, as the highest degree of conformational order was present in solutions containing a large proportion of water. In addition the formation of this structure takes place in a cooperative manner.

In the case of the sequence (Ile)₃-(Val)₃, the most interesting result has been shown by the conformational behaviour of the water soluble peptide 30, which folds in a β -extended conformation in aqueous solution, with at least partial antiparallel orientation of the strands.

These results are utilized to discuss whether and to what extent small assemblies of tertiary structure segments can fold in aqueous solution.

Zusammenfassung.

Es wurden die Vorhersageschemata von Chou und Fasman und von Lifson und Sander über die Ermittlung der bevorzugten Konformationen von Aminosäureresten benutzt, um die Peptidsequenzen $(Ile)_n$ -Gly-Pro-Gly-Gly-(Val) $_n$ mit $n = 0, 1, 3, 5$ als synthetische Analogien für die Sequenzen (74-91) und (77-91) von Thioredoxin von *E. coli* zu entwerfen.

Laut Röntgenstruktur des Proteins falten sich die natürlichen Segmente als irreguläre β -Haarnadelbiegung.

Die zwei Vorhersageschemata sind komplementär, insofern als die Theorie von Chou und Fasman die kurzreichenden nachbarschaftsabhängigen Wechselwirkungen als die dominierenden Kräfte für die Ausbildung von Sekundärstrukturen betrachtet, während die Methode von Lifson und Sander die fernreichenden Wechselwirkungen zwischen gegenüberliegenden Aminosäureresten in β -Faltblattstrukturen herausstreicht.

Die natürlichen Sequenzen (74-91) und (77-91) wurden vorher synthetisiert und CD-Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Peptide nicht in der Lage sind, in der nativen Raumstruktur zu falten, weder in wässrigen noch in organischen Lösungsmitteln.

Diese Tatsache wird hier auf der Basis der oben angeführten statistischen Methoden diskutiert.

Die drei kürzeren Glieder dieser Reihe, und zwar Tfa-Gly-Pro-Gly-Gly-OMe (8), BOC-Ile-Gly-Pro-Gly-Gly-Val-OMe (11) und BOC(Ile) $_3$ -Gly-Pro-Gly-Gly-(Val) $_3$ -OMe (22) wurden mit konventionellen Methoden in Lösung synthetisiert.

Vor allem haben wir die Technik der Fragmentkondensation und die Mischanhydrid-Verfahren als Kupplungsmethode verwendet. Die Peptide wurden mittels Massen- und 1H -NMR-Spektroskopie, Aminosäuren- und Elementar-Analyse und Dünnschichtchromatographie mit verschiedenen Laufmitteln charakterisiert.

Die Synthese des grösseren Homologs dieser Serie ($n = 5$) wurde erfolglos mit der Flüssigphasen-Peptidsynthesemethode versucht, jeweils mit der Fragmentkondensationstechnik.

Es wurde auch ein anderes Peptidfragment, nämlich $(\text{Ile})_3-(\text{Val})_3$ synthetisiert, um die Fähigkeit von Isoleucin- und Valin-Resten, bei der Stabilisierung von antiparallelen β -Faltblattstrukturen mitzuwirken, zu prüfen.

Die Synthese dieser Sequenz wurde mit beiden Verfahren durchgeführt, um die Peptide $\text{BOC}-(\text{Ile})_3-(\text{Val})_3-\text{OMe}$ (23) und $\text{BOC}-(\text{Ile})_3-(\text{Val})_3-\text{NHPEGM}$ (30) zu gewinnen.

Zur Aufklärung der Raumstrukturen aller synthetischen Produkte in wässrigen und organischen Lösungsmitteln wurde die CD-Spektroskopie verwendet.

Aus der Untersuchung der CD-Eigenschaften geht hervor, dass die Kettenlänge einen deutlichen Einfluss auf die Konformation der Sequenz $(\text{Ile})_n-\text{Gly-Pro-Gly-Gly}-(\text{Val})_n$ hat. Das heisst: Während das Tetrapeptid nicht fähig ist, in einer bestimmten Sekundärstruktur zu falten, weisen die Peptide 11 und 22 intramolekulare β -Strukturen auf.

Der interessanteste Fall war der des Decapeptids, da die höhere Strukturstufe nur dann auftritt, wenn die Lösungsmittel einen grösseren Wassergehalt haben.

Auch die Peptidsequenz $(\text{Ile})_3-(\text{Val})_3$ bildet eine stabile Sekundärstruktur in wässrigen Lösungsmitteln aus, die aus CD- und UV-Untersuchungen als (partielle) antiparallele β -Faltblattstruktur erkennbar ist.

Anhand dieser Befunde wird diskutiert, ob und bis zu welcher Grenze kleine Aggregate von Tertiärstrukturen in wässriger Lösung falten können.