



Communication / Preliminary communication

## Conception d'un peptide amphiphile en « faisceaux d'hélices »

Philippe Barthe \*, Martin Cohen-Gonsaud, Gudrun Aldrian-Herrada, Alain Chavanieu, Gilles Labesse, Christian Roumestand

Centre de biochimie structurale, UMR CNRS 5048, Inserm 554, UM I, faculté de pharmacie, 15, av. Charles-Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier cedex 5, France

Reçu le 15 mai 2003 ; accepté le 23 septembre 2003

Disponible sur internet le 15 avril 2004

### Résumé

Cet article décrit la conception d'un peptide amphiphile basé sur une plate-forme structurale constituée de deux hélices- $\alpha$  maintenues en épingle à cheveux par deux ponts disulfure. L'étude structurale préliminaire de ce peptide, réalisée par résonance magnétique nucléaire, est discutée. *Pour citer cet article : P. Barthe et al., C. R. Chimie 7 (2004).*  
© 2004 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

### Abstract

**Design of an amphipatic  $\alpha$ -helical hairpin peptide.** The design of an amphipatic peptide is summarized. It is based on an  $\alpha$ -helical hairpin scaffold stabilized by two interhelical disulfide bridges. The preliminary NMR study is discussed. *To cite this article: P. Barthe et al., C. R. Chimie 7 (2004).*  
© 2004 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

*Mots clés :* Peptide amphiphile ; Motif « double hélice » ; Ponts disulfure ; RMN

*Keywords:* Amphipatic peptide;  $\alpha$ -helical hairpin; Disulfide bridges; NMR

### 1. Introduction

La détermination par résonance magnétique nucléaire (RMN) de la structure tridimensionnelle de la protéine humaine p8<sup>MTCP1</sup> a montré un repliement original, constitué de trois hélices associées par trois ponts disulfure [1]. Les deux premières hélices sont maintenues antiparallèles par deux ponts disulfure, et forment un motif « double hélice » d'environ 40 acides

aminés. La troisième hélice, plus hydrophile, n'interagit que faiblement avec le motif « double hélice » [2]. Un peptide de 38 acides aminés,  $\alpha_2$ p8, correspondant au motif « double hélice » de la protéine humaine p8<sup>MTCP1</sup> a déjà été synthétisé et caractérisé [3]. La structure tridimensionnelle de ce peptide (Fig. 1a), déterminée par RMN, montre la conservation du repliement avec deux hélices  $\alpha$  antiparallèles. La stabilisation de l'édifice par deux ponts disulfure à l'interface des deux hélices suggère qu'un grand nombre de mutations sont possibles, sans que soit altéré le repliement du peptide. Ce nouveau motif structural minimal, fa-

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : P.Barthe@cbs.cnrs.fr (P. Barthe).

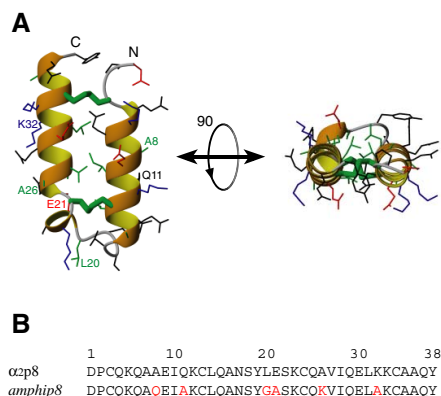


Fig. 1. (a) Représentation en ruban de la structure RMN moyenne du peptide  $\alpha_2p8$  (code PDB : 1ei0). Les chaînes latérales des acides aminés sont représentées en vert pour les résidus hydrophobes, en bleu pour les résidus chargés positivement, en noir pour les autres résidus. Les acides aminés remplacés pour la conception d'*amphip8* sont notés. Les deux vues sont séparées par une rotation de 90° selon l'axe horizontal. (b) Alignement des séquences primaires des peptides  $\alpha_2p8$  et *amphip8*. Les acides aminés mutés sont colorés en rouge.

cile à produire par synthèse chimique ou par sur-expression dans *E. coli*, représente une plate-forme structurale stable pouvant être utilisée comme base pour la conception de nouvelles mini-protéines mimant, notamment, des faisceaux d'hélices impliqués dans la fonction d'un grand nombre de protéines [4].

Dans cet article, nous décrivons la conception d'un peptide amphiphile de 38 acides aminés (nommé *amphip8*) basé sur le motif minimal structural  $\alpha_2p8$  (Fig. 1b). L'intégrité structurale du peptide de synthèse a été contrôlée par RMN.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Synthèse peptidique

Le peptide *amphip8* de 38 acides aminés a été synthétisé sur une résine Fmoc-PAL-PEG-PS (Applied Biosystems, France) avec un synthétiseur Pioneer<sup>TM</sup> en flux continu. Le produit final, analysé en HPLC sur phase-inverse, présente un pic majeur représentant environ 65% du matériel total élué (données non montrées). Les quatre cystéines du peptide *amphip8* ont été protégées avec le même groupement protecteur, le trityl. Le peptide est déprotégé et coupé de la résine avec

le réactif K (82,5% TFA, 5% phénol, 5% thioanosole, 5% H<sub>2</sub>O, 2,5% éthanedithiol) pendant environ 4 h. L'oxydation du peptide est réalisée à température ambiante dans un tampon Hepes (5 mM) à pH 8,5 pendant 2 j sous agitation à l'air libre.

La pureté et l'identité du peptide purifié ont été vérifiées par HPLC analytique et par spectrométrie de masse en *electrospray* (masse déterminée : 4160,02 Da, masse théorique : 4158,85 Da). Le peptide oxydé a été obtenu avec un rendement de 30,4%.

### 2.2. Mesures RMN

Toutes les expériences RMN, i.e., DQF-COSY, *z*-TOCSY et NOESY ont été enregistrées à différentes températures (15 °C, 25 °C, 35 °C et 45 °C) sur un spectromètre Bruker AMX 600 équipé d'une sonde triple résonance (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N) avec gradient-*z*. La concentration de tous les échantillons était de 2 mM dans H<sub>2</sub>O (5% de D<sub>2</sub>O pour le *lock*) ou dans D<sub>2</sub>O à pH 5,6.

## 3. Résultats

### 3.1. Conception et synthèse

Les faisceaux d'hélices sont largement impliqués dans la fonction d'un grand nombre de protéines. Le motif minimal structural  $\alpha_2p8$  permet d'entrevoir la construction d'une petite protéine amphiphile (*amphip8*), qui posséderait, sur un côté, une surface hydrophile et chargée et, sur l'autre, une surface hydrophobe apte à interagir avec des faisceaux d'hélices de protéines de taille plus importante. L'analyse de la structure du peptide  $\alpha_2p8$  (code de la Protein Data Bank : 1ei0) suggère la possibilité d'introduire quelques mutations susceptibles de modifier la lipophilie du peptide, sans en dégrader le motif structural.

Il est important de rappeler que la séquence primaire d' $\alpha_2p8$  provient en grande partie de la séquence correspondant aux deux premières hélices de la protéine humaine p8<sup>MTCP1</sup> [1]. Pour p8<sup>MTCP1</sup>, une troisième hélice vient, par son extrémité NH<sub>2</sub> terminale, compléter le cœur hydrophobe de la protéine. De ce fait,  $\alpha_2p8$

possède déjà des acides aminés hydrophobes exposés au solvant, tels que : Ala<sup>7</sup>, Leu<sup>14</sup>, Ile<sup>28</sup> et Ala<sup>35</sup>. Afin d'étendre cette surface hydrophobe pour notre nouveau peptide *amhip8*, les résidus Gln<sup>11</sup>, Glu<sup>21</sup> et Lys<sup>32</sup> ont été remplacés par des alanines.

Sur la face opposée, déjà riche en acides aminés chargés (Lys<sup>5</sup>, Glu<sup>9</sup> et Lys<sup>12</sup> pour l'hélice I ; Glu<sup>30</sup> et Lys<sup>33</sup> pour l'hélice II) l'Ala<sup>26</sup> a été remplacée par une lysine. Ce choix a été motivé tout d'abord par l'objectif de remplacer un résidu hydrophobe par un résidu chargé, mais aussi par celui de tenter de créer un pont salin avec la chaîne latérale du Glu<sup>30</sup> et stabiliser ainsi l'hélice II.

L'Ala<sup>8</sup>, correspondant à une cystéine orpheline dans la séquence de p8<sup>MTCP1</sup>, est très exposée au solvant. Elle se trouve au milieu de l'hélice I, sur la face opposée à l'espace inter-hélice. Bien qu'elle n'altère pas la géométrie structurale de la protéine native [2], cette alanine est remplacée pour *amhip8* par une glutamine plus hydrophile. En revanche, l'Ala<sup>36</sup>, qui est sur la face exposée au solvant de l'hélice II, a été conservée.

Finalement, la Leu<sup>20</sup>, située dans la boucle entre les deux hélices, a été remplacée par une glycine. Cette mutation devrait améliorer la flexibilité de la charnière entre les deux hélices et favoriser la structuration du peptide lors de la formation des deux ponts disulfure par oxydation ménagée des quatre cystéines (voir § *Matériels et méthodes*).

### 3.2. Caractérisation conformationnelle

Nous avons débuté une étude structurale du peptide *amhip8* par RMN du proton à 600 MHz. Le peptide réduit, sans pont disulfure, présente un spectre RMN caractéristique d'un peptide qui n'est pas replié, avec un « entassement » des résonances de protons amides (H<sub>N</sub>) sur une largeur spectrale inférieure à 1 ppm, ainsi qu'une très faible dispersion des protons *alpha* (H<sub>α</sub>) et des protons des groupements méthyle (Fig. 2a). En revanche, le spectre RMN du peptide oxydé est plus éclaté, traduisant une structuration du peptide (Fig. 2b). La présence d'un nombre important de pics de corrélations NOESY dans la zone des protons amide (spectre non montré) traduit la présence d'une structuration secondaire en hélice. Nous avons donc poursuivi l'étude RMN sur le peptide oxydé.

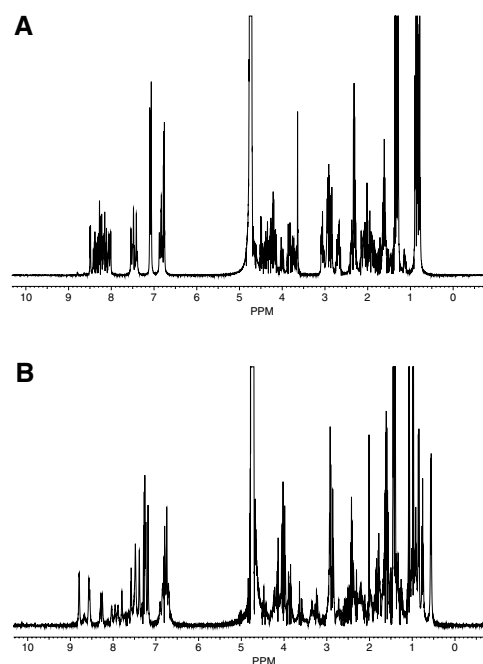


Fig. 2. Spectres RMN (600 MHz, 25 °C) du peptide *amhip8* (2 mM, dans H<sub>2</sub>O, 5% D<sub>2</sub>O, pH 5,6). (a) Le peptide est réduit. (b) Le peptide est oxydé avec formation de deux ponts disulfure.

L'attribution séquentielle des résonances des protons a été réalisée selon la méthode classique de Wüthrich [5]. La procédure implique : (1) l'identification des systèmes de spins des acides aminés sur la base des spectres 2D-TOCSY et (2) la connectivité de ces systèmes de spins selon la séquence en utilisant les pics de corrélations séquentiels  $d_{\alpha N}$  et  $d_{NN}$  des spectres 2D-NOESY. Cette étape d'attribution des résonances des protons du squelette peptidique a été facilitée par la faible différence générale observée entre les déplacements chimiques des protons des acides aminés correspondants de  $\alpha_2$ p8 et d'*amhip8*.

Cependant, des différences significatives apparaissent pour plusieurs acides aminés quand on compare leurs déplacements chimiques avec ceux du peptide  $\alpha_2$ p8 (Fig. 3). Au niveau des H<sub>N</sub>, certains acides aminés mutés (20, 21, 26 et 32) subissent des variations importantes, alors que les positions 8 et 11 ne semblent pas être touchées. Mais on note surtout des changements importants pour des résidus hydrophobes (Ile<sup>10</sup>, Leu<sup>14</sup>, Leu<sup>31</sup> et Ala<sup>35</sup>) qui sont disposés sur la même surface dans la structure modèle du peptide  $\alpha_2$ p8. Le H<sub>N</sub> de la Ser<sup>18</sup> est aussi déplacé, ainsi que ceux des Gln<sup>25</sup> et Gln<sup>29</sup> qui se trouvent sur la face externe de l'hélice II.

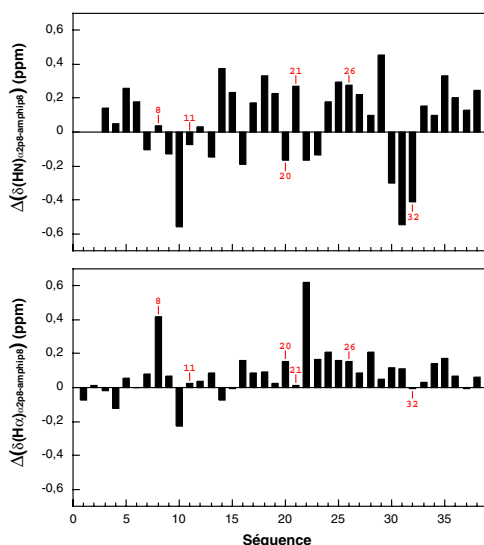


Fig. 3. Différences des déplacements chimiques calculées pour les protons  $H_N$  et  $H_\alpha$  (respectivement en haut et en bas) entre les peptides  $\alpha_2p8$  et *amphip8* en fonction de la séquence. La position des acides aminés mutés pour *amphip8* est indiquée.

En ce qui concerne les  $H_\alpha$ , des acides aminés mutés, surtout les positions 8, 20 et 26, subissent des déplacements importants. Mais également d'autres acides aminés présentent des variations plus importantes, comme l'Ile<sup>10</sup>, la Ser<sup>22</sup>, la Cys<sup>24</sup>, l'Ile<sup>28</sup> et l'Ala<sup>35</sup>.

#### 4. Discussion

Les six mutations choisies pour concevoir *amphip8* sur la base de la plate-forme structurale  $\alpha_2p8$  ne concernent pas l'interface hydrophobe des hélices, qui peut apporter une contribution majeure à la stabilisa-

tion de l'édifice en faisceaux d'hélices [6]. Ces mutations ne sont donc pas censées altérer la structuration du peptide. Ceci est conforté par la présence de nombreux pics de corrélations NOESY dans la région des protons amide. Cependant, les variations de déplacements chimiques des protons observées entre  $\alpha_2p8$  et *amphip8* ne s'expliquent pas par la simple présence directe de quelques mutations ponctuelles. La formation d'un dimère, après mutation, pourrait expliquer en partie ces différences de déplacements chimiques. En effet, la construction d'une petite protéine amphiphile possédant une surface hydrophobe pourrait induire une dimérisation du peptide visant à enfouir les acides aminés hydrophobes. Il devient donc important de déterminer la structure RMN de ce peptide *amphip8* afin d'élucider clairement les variations de déplacements chimiques des protons observées entre  $\alpha_2p8$  et *amphip8*.

#### Références

- [1] P. Barthe, Y.S. Yang, L. Chiche, F. Hoh, M.P. Strub, L. Guignard, J. Soulier, M.H. Stern, H. van Tilbeurgh, J.-M. Lhoste, C. Roumestand, *J. Mol. Biol.* 274 (1997) 801.
- [2] P. Barthe, L. Chiche, N. Declerck, M.A. Delsuc, J.F. Lefevre, T. Malliavin, J. Mispelter, M.H. Stern, J.M. Lhoste, C. Roumestand, *J. Biomol. NMR* 15 (1999) 271.
- [3] P. Barthe, S. Rochette, C. Vita, C. Roumestand, *Protein Sci.* 9 (2000) 942.
- [4] A. Lupas, *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996) 375.
- [5] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley, New York, 1986.
- [6] N.E. Zhou, C.M. Kay, R.S. Hodges, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 2664.