

Circulardichroismusuntersuchungen des Thyreotropin-Releasinghormons (TRH)

Circular Dichroism Investigations of TRH

WOLFGANG VOELTER, KARL ZECH, PETER GÖBEL, OSKAR OSTER und ANTONIO ATTANASIO

Chemisches Institut der Universität Tübingen

(Z. Naturforsch. **30b**, 142–143 [1975]; eingegangen am 15. September 1973)

Circular Dichroism, Releasing Hormones, Peptides

Im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Struktur¹⁻³ und Wirkungsweise⁴ der kürzlich aufgeklärten^{5,6} Hypothalamus-Releasinghormone haben wir Circulardichroismus(CD)-Spektren des Thyreotropin-Releasinghormons (TRH) vermessen, da mit der Methode des CD konformative und konfigurative Änderungen optisch aktiver Moleküle nachweisbar sind.

TRH wird durch Kuppeln der Aminosäurederivate Benzyloxycarbonyl-(4.4'-dimethoxybenzhydryl)-L-glutamin, L-Histidin-methylester und L-Prolinamid mit N.N'-Dicyclohexylcarbodiimid dargestellt³. Die Primärstruktur von TRH ist Pyr-His-Pro-NH₂.

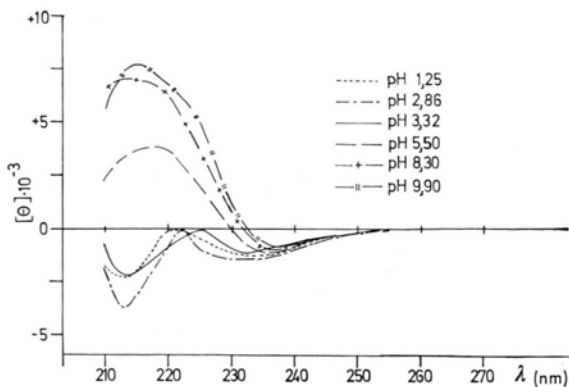


Abb. 1. CD-pH-Abhängigkeit von TRH.

Abb. 1 zeigt CD-Spektren von TRH bei verschiedenen pH-Werten. Auffallend ist, daß das Peptidhormon bei pH-Werten > 5 einen intensiven positiven Cottoneneffekt zwischen 214 und 220 nm ($[\theta] \approx 4000-7100$) und einen schwächeren negativen bei 230 bis 240 nm ($[\theta] \approx -700$ bis -1000), in sauren Lösungen dagegen negative Cottoneneffekte bei 213 nm und zwischen 230 und 240 nm zeigt.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. VOELTER, Chemisches Institut, D-7400 Tübingen, Auf der Morgenstelle.

Das CD-Spektrum von TRH in wäßriger und alkalischer Lösung entspricht im wesentlichen dem von Aminosäuren, deren Seitenketten keine meßbaren chromophoren Gruppen enthalten (L-Alanin, L-Asparagin etc.): Alle L-Aminosäuren dieser Art zeigen je nach dem Protonierungsgrad im Bereich 200 bis 216 nm positive Cottoneneffekte^{8,9}, die durch einen $n \rightarrow \pi^*$ -Elektronen-Übergang der Carboxylgruppe verursacht werden.

Um die pH-Abhängigkeit der TRH-CD-Spektren zu deuten, haben wir von L-Histidin und L-Alanyl-L-Prolin als Modelle Circulardichroismusspektren gemessen. In Abb. 2 sind die Circulardichroismusspektren von L-Histidin bei pH 1,3 und 11,1 aufgenommen. Wie Abb. 2 zeigt, verursacht der benachbarte Imidazolrest eine Erhöhung der Rotatorstärke und eine bathochrome Verschiebung des durch die Carboxylgruppe verursachten Cottoneneffektes (λ_{\max} 215–220 nm; $[\theta] = 5000-7000$)^{8,9}.

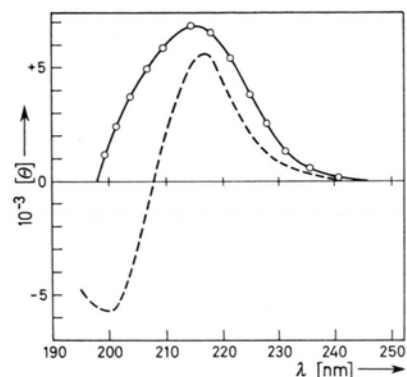


Abb. 2. Circulardichroismusspektren von L-Histidin (—o—o—o— pH 1,30; ——— pH 11,10).

Um den Beitrag des Prolinrestes zu den Cottoneneffekten im Circulardichroismusspektrum des TRH zu studieren, haben wir L-Alanyl-L-prolin synthetisiert und bei pH 0,78, 8,94 und in Methanol gemessen (vgl. Abb. 3). Im Gegensatz zu Aminosäuren

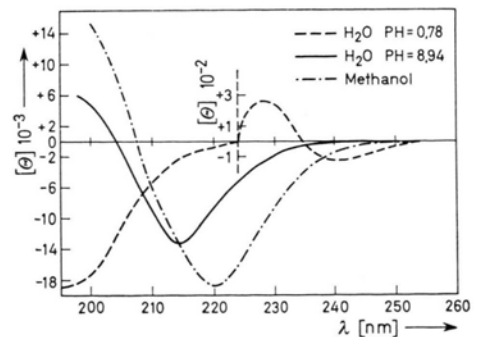


Abb. 3. Circulardichroismusspektren von L-Alanyl-L-prolin (----- pH 0,78; ——— pH 8,94; - - - - - Methanol).

mit einer Alkanseitenkette zeigt das CD-Spektrum dieses Dipeptids in wäßriger Lösung und in Methanol zwischen 210 und 220 nm eine intensive negative Cottoneneffektbande, die sich im stark sauren pH-Bereich nach tiefen Wellenlängen verschiebt; gleichzeitig erhöht sich die Rotatorstärke dieser CD-Bande. Diese starke pH-Abhängigkeit dürfte beim L-Alanyl-L-prolin unter anderem auch mit der Änderung des *cis-trans*-Isomeriegleichgewichtes zusammenhängen¹¹. So haben wir mit ¹³C-Kernresonanz festgestellt, daß Ala-Pro bei pH 9 zu 50% als *cis*- und zu 50% als *trans*-Isomeres vorliegt. Bei pH 1-1,5 ist jedoch zu 100% das *trans*-Isomere existent.

Ebenso wie beim L-Alanyl-L-prolin konnten wir auch beim TRH³ durch ¹³C-Resonanz nachweisen, daß dieses Molekül in Wasser zu 90% als *trans* und 10% als *cis*-Isomeres vorliegt (vgl. Abb. 4). Die frappierenden Unterschiede der CD-Spektren von TRH, in Wasser bzw. bei pH 1 gemessen, ließen sich nach den oben diskutierten Befunden dadurch erklären, daß in wäßriger Lösung die Intensität des Prolin-Peptid-Bindungs- $n \rightarrow \pi^*$ -Cottoneffektes wesentlich kleiner ist als die Intensitäten aller anderen $n \rightarrow \pi^*$ -Cottoneffekte (Peptidbindung + Säureamidgruppe). Gerade umgekehrte Intensitätsverhältnisse der Cottoneffekte müssen durch Protonierung des TRH erreicht werden, so daß bei pH 1 ein CD-Spektrum erhalten wird, das dem von Prolinpeptiden ähnlich ist. Auch eine Verschiebung des *cis-trans*-Isomeriegleichgewichtes durch pH-Wert-

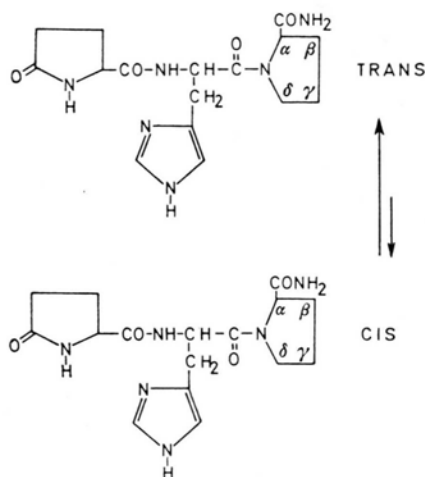


Abb. 4. *Cis-trans*-Isomerie von TRH.

Änderung des Mediums dürfte die Rotatorstärke der Cottoneffekte stark beeinflussen.

Alle Spektren wurden mit einem Gerät der Firma Jasco-Biotronik (Frankfurt) gemessen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für finanzielle Unterstützung. Fr. BRUN danken wir für die Aufnahme der CD-Spektren.

¹ W. VOELTER u. K. ZECH, *Chimia* **26**, 313 [1972].

² W. VOELTER, O. OSTER u. K. ZECH, *Angew. Chem.*, im Druck.

³ K. ZECH, Dissertation, Tübingen 1973.

⁴ K. ZECH, D. GUPTA u. W. VOELTER, *Acta endocr. Suppl.* **173**, 80 [1973].

⁵ K. FOLKERS, F. ENZMANN, J. BØLER, C. Y. BOWERS, u. A. V. SCHALLY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 123 [1969].

⁶ H. MATSUO, Y. BABA, R. M. G. NAIR, A. ARIMURA u. A. V. SCHALLY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 1334 [1971].

⁷ P. CRABBE, *An Introduction to the Chiroptical Methods in Chemistry*, Mexico 1971.

⁸ W. VOELTER, L. FLOHÉ, P. KRAUSS, U. WESER u. E. BAYER, Symposium über experimentelle Probleme der Epilepsie-Forschung, Bethel 1972.

⁹ M. LEGRAND u. R. VIENNET, *Bull. Soc. chim. France* **1965**, 679.

¹⁰ L. I. KATZIN u. E. GULYAS, *J. Amer. chem. Soc.* **90**, 247 [1968].

¹¹ O. OSTER, Dissertation, Tübingen 1973.