

## Aminosäure-Hydrophobieskala

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201813954 Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201813954

## Eine intrinsische Hydrophobieskala für Aminosäuren und ihre Anwendung auf fluorierte Verbindungen

Waldemar Hoffmann,\* Jennifer Langenhan, Susanne Huhmann, Johann Moschner, Rayoon Chang, Matteo Accorsi, Jongcheol Seo, Jörg Rademann, Gerard Meijer, Beate Koksch, Michael T. Bowers, Gert von Helden und Kevin Pagel\*

Abstract: Es existieren über 100 Hydrophobieskalen für Aminosäuren, die auf unterschiedlichen Ansätzen basieren und einheitlich in kondensierter Phase ermittelt werden. Ein Vergleich der Hydrophobiewerte aus verschiedenen Methoden und die Ermittlung ihrer relativen Rangfolge sind jedoch anspruchsvoll, da die Wechselwirkungen zwischen der Umgebung und der Aminosäure in jeder Methode spezifisch sind. Hier überwinden wir diese Einschränkung, indem wir die Eigenschaften von Aminosäuren in der Reinraumumgebung der Gasphase untersuchen. In der Gasphase bleiben standardmäßig entropische Beiträge des hydrophoben Effektes aus, und nur die Polarität der Seitenkette ist für die Selbstorganisation entscheidend. Dies ermöglicht die Ableitung einer neuartigen Hydrophobieskala, die ausschließlich auf der Interaktion einzelner Aminosäureeinheiten innerhalb des Clusters basiert und somit die Eigenschaften der Seitenketten besser abbildet. Dieses Prinzip kann für die Klassifizierung von nicht-natürlichen Derivaten angewendet werden, wie hier für fluorierte Aminosäurevarianten gezeigt ist.

**D**ie genaue Bestimmung der intrinsischen Hydrophobie von Aminosäuren ist entscheidend für das Verständnis von wichtigen Aspekten in der Biologie und die Implementierung von nicht-kanonischen Aminosäuren beim rationalen Design

_	
[*]	Dr. W. Hoffmann, Dr. S. Huhmann, Dr. J. Moschner, R. Chang, M. Accorsi, Prof. Dr. J. Rademann, Prof. Dr. B. Koksch, Prof. Dr. K. Pagel Freie Universität Berlin Fachbereich für Biologie, Chemie und Pharmazie Takustraße 3 / Königin-Luise-Straße 2 + 4, 14195 Berlin (Deutsch- land) E-Mail: w.hoffmann@fu-berlin.de kevin.pagel@fu-berlin.de
	Dr. W. Hoffmann, J. Langenhan, R. Chang, Prof. Dr. J. Seo, Prof. Dr. G. Meijer, Prof. Dr. G. von Helden, Prof. Dr. K. Pagel Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft Abteilung Molekülphysik Faradayweg 4–6, 14195 Berlin (Deutschland)
	Prof. Dr. M. T. Bowers University of California Santa Barbara Department of Chemistry & Biochemistry Santa Barbara, California 93106 (USA) Prof. Dr. L. Seo
	aktuelle Adresse: University of Science and Technology (POSTECH) Fachbereich Chemie, 77 Cheongam-ro, Pohang 37673 (Republik Korea)
<b>D</b>	Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummern (ORCIDs) einiger Autoren sind unter: https://doi.org/10.1002/ange.201813954 zu finden.

von Peptiden und Proteinen. Viele grundlegende biologische Prozesse wie Faltung,<sup>[1]</sup> Stabilität<sup>[2]</sup> und Oligomerisierung<sup>[3]</sup> von Proteinen sowie Protein-Ligand-Wechselwirkungen<sup>[4]</sup> werden stark durch den hydrophoben Effekt in Lösung beeinflusst, bei dem unpolare Aminosäurereste aus einer entropisch ungünstigen Hydrathülle freigegeben werden. Bis heute wurden mehr als 100 Hydrophobieskalen<sup>[5]</sup> aufgestellt, wobei die Mehrheit der Skalen auf bekannten Methoden in kondensierter Phase wie der Wasser/Octanol-Verteilung,<sup>[6]</sup> Berechnungen der zugänglichen Oberfläche,<sup>[7]</sup> direkten Messungen der physikalischen Eigenschaften<sup>[8]</sup> oder chromatographischen Methoden<sup>[9]</sup> beruht. Dabei bestehen signifikante Unterschiede zwischen diesen Skalen, da sie deutlich unterschiedliche Prinzipien anwenden oder sich in der Art der untersuchten Spezies unterscheiden.<sup>[7,10]</sup>

Eine genauere Bewertung dieser Hydrophobiemessungen zeigt jedoch die Grenzen der jeweiligen Ansätze auf. In Skalen, die auf Partitionierung basieren, werden organische Lösungsmittel wie Octanol verwendet, um den hydrophoben Kern der Proteine zu imitieren. Dabei wird Trp als die hydrophobste Aminosäure eingestuft.<sup>[6]</sup> Allerdings lösen sich organische Lösungsmittel oft bis zu einem gewissen Grad in Wasser und verändern so die Eigenschaften beider Phasen. Diese Vermischung erschwert es, eine unverzerrte Hydrophobieskala zu erhalten. Oberflächenberechnungen hingegen nutzen Daten aus Proteindatenbanken. Die Hydrophobie wird hierbei als die Tendenz einer Aminosäurenseitenkette, sich im Inneren des Proteins und nicht auf dessen Oberfläche zu befinden, definiert.<sup>[7]</sup> Cys wird als hydrophobste Aminosäure klassifiziert, da es über die Thiolgruppe Disulfidbrücken bilden kann, die sich typischerweise im Kern einer globulären Proteinstruktur befinden. Die vielleicht bekannteste und auf physikalischen Eigenschaften basierende Skala vergleicht die Oberflächenspannung von Aminosäurelösungen in Bezug auf eine Gly-Lösung.<sup>[8]</sup> Leu wird als hydrophobste Aminosäure eingeordnet, da es die geringste Oberflächenspannung verursacht. Pro, Arg und Lys liegen aufgrund des isoelektrischen Punktes bei diesen Messungen jedoch in einem anderen ionischen Zustand als die Referenz vor, wodurch es zu Diskrepanzen gegenüber anderen Hydrophobieskalen kommt. Chromatographische Methoden<sup>[9]</sup> hingegen nutzen Aminosäurederivate oder Modellpeptide, um die Hydrophobie als Änderung der Retentionszeit im Vergleich zu einem Gly-substituierten Analogon zu definieren. Im Falle des Modellpeptidansatzes wirkt sich die Änderung der Peptidsequenz,<sup>[9,11]</sup> der Peptidlänge<sup>[11]</sup> und der Substitutionsstelle<sup>[12]</sup> stark auf die Hydrophobiewerte aus.<sup>[9-10,12]</sup> Darüber hinaus beeinflussen die Wahl des Porendurchmessers, der pH- Wert der Pufferlösung, die Temperatur oder die Bindungsdichte der Alkylketten in der stationären Umkehrphase auch die Hydrophobieskala.<sup>[5b]</sup>

Die gängigen Hydrophobieskalen ermöglichen aufgrund von Verzerrungen in der Regel weder einen universellen Vergleich noch eine genaue Klassifizierung von Aminosäuren. Nachfolgend stellen wir daher eine alternative und unverzerrte Rangordnung der Hydrophobie vor. Diese beruht auf der Wechselwirkung von einzelnen Aminosäuren in Aminosäureclustern in der Gasphase. Obwohl auf den ersten Blick kontraintuitiv, eignen sich die Gasphasenbedingungen besonders gut, da die zugrunde liegende relative Permittivität im Vakuum ( $\varepsilon_r = 1$ ) der des Proteininneren sehr ähnlich ist  $(\varepsilon_r = 6-7)$ .<sup>[14]</sup> Es gibt bereits vielversprechende Studien, in denen die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Molekülen in der Gasphase untersucht wurden, z. B. mittels differentieller Mobilitätsspektrometrie.<sup>[15]</sup> Unsere Studie verwendet die Gasphasentechnik Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie (IM-MS), in der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) sowie ihrer Größe und Form getrennt werden.<sup>[16]</sup> Sie liefert den räumlich gemittelten Stoßquerschnitt eines Ions ( $\Omega$ , CCS) – eine molekulare Eigenschaft, die spezifisch für die Wechselwirkung des Ions mit dem Trägergas ist und ein Maß für das Volumen der Aminosäuren in Clustern darstellt.<sup>[17]</sup>

In dieser Arbeit wird der <sup>DT</sup>CCS<sub>He</sub> verwendet (CCS, gemessen im He-Trägergas mit einem Driftröhreninstrument,<sup>[17]</sup> hier bezeichnet als  $\Omega$ ), um den Zusammenhang zwischen der Größe des Aminosäureclusters und der Seitenkettenpolarität zu untersuchen. Abbildung 1a zeigt die mittels Nanoelektrospray-Ionisation (n-ESI) aufgenommenen Massenspektren von Leu und Arg (5 mM), die aus einer wässrigen Lösung ionisiert wurden. Leu aggregiert zu einem Dimer n/z = 2:1, zusammen mit größeren Clustern von einem Oktamer bis zu einem 36-mer mit n/z = 36:4, wobei *n* für die Anzahl der Leu-Einheiten im Cluster und z für die Ladung steht. Das polarere Arg, das eine Guadininseitenkette trägt, verhält sich anders: Es aggregiert schrittweise, und Cluster bis zu einem 24-mer können beobachtet werden. Andere Aminosäuren aggregieren in ähnlicher Weise (siehe Hintergrundinformationen und Lit. [18]).

Die CCSs als Funktion der Anzahl der Oligomere n, gemessen mittels IM-MS, sind in Abbildung 1b für Leu (oben) und Arg (unten) dargestellt. Die Messunsicherheiten der CCS-Werte sind hierbei deutlich kleiner als die tatsächliche Größe der darstellenden Symbole. Die schwarze, durchgezogene Linie entspricht dem theoretischen isotropen Wachstum<sup>[19]</sup> und repräsentiert das Wachstum einer idealisierten kugelförmigen Anordnung. Daraus ergibt sich die Gleichung  $\Omega = \sigma_1 n^{2/3}$ , wobei  $\sigma_1$  die CCS des entsprechenden Monomers und n die Anzahl der Aminosäureeinheiten im Cluster ist. Augenscheinlich bildet Leu größere Cluster, als durch das theoretisch isotrope Wachstum vorhergesagt, während das polare Arg zu kompakteren Oligomeren aggregiert. Die resultierende Packungseffizienz ist unabhängig von der Größe der Monomereinheiten ( $\Omega_{\text{Leu}} = 66 \text{ Å}^2$  gegenüber  $\Omega_{\text{Arg}} =$ 72 Å<sup>2</sup>), was darauf schließen lässt, dass die Clusterbildung stark von der Polarität der Seitenketten beeinflusst wird. Eine ähnliche Abhängigkeit zwischen Clusterwachstum und Sei-



**Abbildung 1.** Massenspektrum und Kollisionsquerschnitte ( $\Omega$ , <sup>DT</sup>CCS<sub>He</sub>) für Leu und Arg. a) *n*-ESI-Massenspektren, erhalten aus konzentrierten (5 mM), wässrigen Aminosäurelösungen. Die am häufigsten auftretenden Cluster sind mit ihrem *n/z*-Verhältnis gekennzeichnet, wobei *n* die Anzahl der Aminosäureeinheiten im Cluster und *z* die Ladung darstellt. b)  $\Omega$  als eine Funktion der Anzahl der Oligomere *n*. Die durchgezogene, schwarze Linie stellt ein theoretisch isotropes Wachstum dar,<sup>[13]</sup> d.h. das Wachstum einer idealisierten kugelförmigen Anordnung, während die rote Linie die Kurvenanpassung des jeweiligen Hydrophobiewertes  $\alpha$  zeigt. Der Fehler des gemessenen <sup>DT</sup>CCS<sub>He</sub> ist deutlich kleiner (typischerweise <1% für drei unabhängige Replikate) als die Größe des Symbols.

tenkettenpolarität wurde vor kurzem für verschiedene Aminosäuren beobachtet<sup>[18c]</sup> und wird für alle kanonischen Aminosäuren innerhalb dieser Arbeit systematisch bestätigt (siehe Hintergrundinformationen für Details). Diese Daten zeigen deutlich, dass hydrophobe Aminosäuren im Allgemeinen größere Cluster bilden als polare Aminosäuren. Ihre unpolaren Seitenketten orientieren sich in der Umgebung niedriger Permittivität vermutlich nach außen, wodurch die Cluster "sperriger" werden. Polare Aminosäuren bilden eher kompaktere Cluster, da ihre funktionellen Gruppen intermolekulare Wechselwirkungen begünstigen. Zuschriften

Um den vorgenannten Trend des Clusterwachstums systematisch zu bewerten, wurde ein Korrekturfaktor  $\alpha$  abgeleitet, anhand dessen die Abweichung vom theoretischen isotropen Wachstum entsprechend  $\Omega = \sigma_1 n^{2/3} \alpha^{2/3}$  abgeschätzt werden kann. Dieser  $\alpha$ -Wert stellt ein Maß für die Packungsdichte im Cluster dar und korreliert direkt mit der Polarität der entsprechenden Seitenkette. Werte von  $\alpha > 1$  repräsentieren hydrophobe Aminosäuren, während  $\alpha < 1$  auf hydrophile Seitenketten hinweist. Der typische Fehler von  $\alpha$  ist kleiner als 1%. Damit bietet  $\alpha$  eine ideale Grundlage für eine neuartige, unverzerrte Hydrophobieskala für Aminosäuren.

Eine Zusammenfassung der  $\alpha$ -Werte in Abhängigkeit von der Größe ( $\Omega$ ) ist in Abbildung 2 dargestellt. Die untersuchten Aminosäuren unterscheiden sich zwar in ihrer Nei-



**Abbildung 2.** Relative Hydrophobieskala für Aminosäuren; Hydrophobie  $\alpha$  als Funktion der Größe der Aminosäure (angegeben als Monomer  ${}^{\text{DT}}\text{CCS}_{\text{Her}} \Omega$ ). Werte für  $\alpha > 1$  stellen hydrophobe Aminosäuren dar, wobei  $\alpha < 1$  für hydrophile Seitenketten steht. Die fluorierten Varianten der Aminosäuren sind in grüner Farbe dargestellt.

gung, Cluster zu bilden, sie alle zeigen jedoch Cluster bis zum Ladungszustand 2+. Darüber hinaus können Aminosäuren mit höherem Ladungszustand einen zusätzlichen Einfluss auf die Anordnung der Cluster haben. Die Stärke der hieraus resultierenden Wechselwirkungen wäre von der Art der Seitenketten abhängig.<sup>[20]</sup> Um vergleichbare Datensätze zu gewährleisten und den Einfluss möglicher elektrostatischer Wechselwirkungen wie Ionen-Dipol/induzierter-Dipol- oder Coulomb-Wechselwirkungen auf die Packungseffizienz in höheren Ladungszuständen zu minimieren, wurden deshalb nur die Ladungszustände 1 + und 2 + zur Bestimmung von  $\alpha$  verwendet.

In der resultierenden Hydrophobieskala werden die natürlichen Aminosäuren Leu > Val  $\approx$  Met > Ile > Phe als am hydrophobsten eingestuft, was in guter qualitativer Übereinstimmung mit den bisherigen Skalen ist.<sup>[6a,9]</sup> Darüber hinaus liefert die neue Skala aus chemischer Sicht eine plausible relative Rangfolge der Aminosäuren:

- 1) Phe ( $\alpha = 1.042$ ) ist hydrophober als Tyr ( $\alpha = 0.998$ ), das eine zusätzliche Hydroxygruppe am Phenylring trägt.
- 2) Ser ist eine der hydrophilsten Aminosäuren ( $\alpha = 0.862$ ), was gut mit den Ergebnissen früherer Studien übereinstimmt.<sup>[18c,21]</sup> Der primäre Alkohol macht Ser hydrophiler als Thr ( $\alpha = 0.932$ ), das einen sekundären Alkohol trägt.
- 3) Gln ( $\alpha = 1.043$ ) ist wegen der längeren aliphatischen Kette hydrophober als Asn ( $\alpha = 0.964$ ), während sowohl Gln als auch Asn weniger hydrophil sind als die entsprechenden Carbonsäureanaloga (Glu,  $\alpha = 0.886$  und Asp,  $\alpha = 0.856$ ).
- 4) Lys und Arg tragen entweder eine Guanidingruppe oder ein primäres Amin am Ende der aliphatischen Kette. Die Guanidingruppe ist jedoch polarer, und dementsprechend hat Arg ( $\alpha = 0.909$ ) einen niedrigeren  $\alpha$ -Wert als Lys ( $\alpha =$ 1.003).

Interessanterweise zeigt Lys innerhalb der hier dargestellten Skala weder einen sehr polaren noch einen hydrophoben Charakter. Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen für die kondensierte Phase,<sup>[6a,7,9]</sup> die Lys als eine der polarsten Aminosäuren einstufen. In der Lösung ist die Seitenkette von Lys überwiegend protoniert, während hier die intrinsische Hydrophobie einer im Durchschnitt neutralen Seitenkette untersucht wurde. Somit überwiegt die lange aliphatische Kette den hydrophilen Charakter des neutralen Amins und ergibt einen  $\alpha$ -Wert von ca. 1. Wir behaupten, dass die Eigenschaften der janusköpfigen Seitenkette von Lys mit dieser relativen Rangordnung besser beschrieben sind, da die Protonierung drastisch variieren kann, wenn die Seitenkette im Inneren eines Proteins liegt.<sup>[22]</sup>

Abbildung 3 zeigt einen quantitativen Vergleich zwischen der hier dargestellten Hydrophobieskala und Skalen, die auf Ansätzen in kondensierter Phase basieren, wobei der absolute Pearson-Korrelationskoeffizient |R| als Heatmap dargestellt ist. Ein Wert von |R|=1 (rot) zeigt eine perfekte Korrelation, wobei alle Datenpunkte auf einer Linie liegen, während ein |R|-Wert von 0 (blau) keine Korrelation zwischen den beiden Skalen impliziert. Eine sehr hohe Korrelation (|R| > 0.6) zwischen  $\alpha$  und anderen Hydrophobieskalen wird in der Regel nicht beobachtet, da sie auf sehr unterschiedlichen Ansätzen basieren (Gasphase gegenüber kondensierter Phase). Die anderen Skalen werden durch Lösungsmitteleffekte, die Art der untersuchten Spezies (z.B. verschiedene Peptide) und Parameter wie pH-Wert, chromatographische Ausrüstung sowie Löslichkeit beeinflusst und tragen so zu den Unterschieden in der Korrelationsmatrix bei. Die Daten zeigen jedoch eine positive Beziehung (|R| > 0.35)



**Abbildung 3.** Heatmap des Pearson-Korrelationskoeffizienten | *R* | zwischen der hier vorgestellten Hydrophobieskala  $\alpha$  aller kanonischen Aminosäuren und Skalen, die auf Ansätzen in der kondensierten Phase wie der Wasser/Octanol-Verteilung,<sup>[6a]</sup> HPLC,<sup>[9]</sup> der Berechnung der zugänglichen Oberfläche einer Seitenkette innerhalb eines Proteinkristalls<sup>[7]</sup> und der Messung der Oberflächenspannung einer Aminosäurelösung basieren.<sup>[8]</sup> Rot: positive Korrelation, blau: keine lineare Korrelation.

zwischen der hier vorgestellten Skala und allen etablierten Skalen und stützen somit die Gültigkeit des  $\alpha$ -Ansatzes.

Darüber hinaus wurde die Robustheit des neuen Ansatzes zur Klassifizierung nicht-natürlicher Derivate für die besonders anspruchsvolle Klasse der fluorierten Aminosäuren geprüft. Die H/F-Substitution ist eine gängige Strategie, um die Eigenschaften von Pharmazeutika<sup>[23]</sup> und Peptiden/Proteinen zu verändern.<sup>[24]</sup> Ihr Einfluss auf die Faltung wird durch ein komplexes Zusammenspiel des Interaktionspartners, Veränderungen in der Hydrophobie und der Größe bestimmt, was die Vorhersage ihrer Eigenschaften erschwert.<sup>[25]</sup> Die Hydrophobiewerte für ausgewählte fluorierte Derivate von Ile, Leu und Phe sowie 2-Aminobuttersäure (Abu) sind in Abbildung 2 in Grün dargestellt.

Im Allgemeinen erhöht die CF<sub>3</sub>-Fluorierung in aliphatischen Seitenketten die Hydrophobie gegenüber jener der unsubstituierten Analoga Ile und Val. Die CF<sub>3</sub>-Substitution in (2S,3S)-5,5,5-Trifluorisoleucin (5-F<sub>3</sub>-Ile) verändert die Gesamtgröße jedoch nur geringfügig ( $\Omega_{\text{Ile}} = 66 \text{ Å}^2$  gegenüber  $\Omega_{5}$ - $_{F3-Ile} = 68 \text{ Å}^2$ ), während für 4,4,4-Trifluorvalin (4-F<sub>3</sub>-Val) ein Anstieg von 8–12% in CCS beobachtet wird ( $\Omega_{Val} = 59 \text{ Å}^2$ gegenüber  $\Omega_{4-F3-Val} = 64 \text{ Å}^2$ ). Interessanterweise ergeben die fluorierten Diastereomere von 4,4,4-Trifluorvalin unterschiedliche Hydrophobiewerte: Das (2S,3S)-4-F<sub>3</sub>-Val-Isomer  $(\alpha = 1.061)$  ist we sentlich hydrophiler als 4-F<sub>3</sub>-Val(S,R)  $(\alpha =$ 1.080), jedoch hydrophober als Val ( $\alpha = 1.053$ ). Diese Beobachtung befindet sich in guter Übereinstimmung mit HPLC-Ergebnissen<sup>[3b]</sup> und Simulationen<sup>[26]</sup> und zeigt, dass der hier vorgestellte Ansatz sehr empfindlich für kleinste Strukturunterschiede ist.

Darüber hinaus führt eine CF<sub>2</sub>-Fluorierung zu einem völlig anderen Verhalten: 4,4-Difluoraminobuttersäure (4-F<sub>2</sub>-

Abu;  $\alpha = 1.000$ ) weist einen geringeren  $\alpha$ -Wert auf als das nicht-fluorierte Analogon (Abu;  $\alpha = 1.057$ ). So kann die partielle Fluorierung in aliphatischen Seitenketten die Hydrophobie einer bestimmten Aminosäure drastisch verringern.<sup>[25b]</sup> Eine Vorhersage der Hydrophobie bei H/F-Substitutionen ist nicht trivial, aber mit dem hier vorgestellten Ansatz ist es möglich, Aminosäuren problemlos zu klassifizieren.

Die H/F-Substitution an Phenylringen zeigt wiederum ein besonderes Verhalten: Die H/F-Substitution reduziert die Hydrophobie in der Reihenfolge Phe ( $\alpha = 1.042$ ) > oF-Phe ( $\alpha = 1.026$ ) > mF-Phe ( $\alpha = 1.021$ ) > pF-Phe ( $\alpha = 1.014$ ) >  $F_5$ -Phe ( $\alpha = 0.951$ ). Dieser eher ungewöhnliche Trend ist wahrscheinlich auf Veränderungen in der elektronischen Struktur des aromatischen Rings zurückzuführen. Die Änderung des Dipolmoments durch Fluorierung resultiert in einer Erhöhung der Polarität, was zu dichter gepackten Clustern führt. Dieser Effekt ist noch ausgeprägter, wenn eine Phosphonatgruppe (R-CF<sub>2</sub>-PO(OH)<sub>2</sub> für *p*-CF<sub>2</sub>P-Phe;  $\alpha =$ 0.906) an den Phenylring gebunden ist (siehe Phe gegenüber p-CF<sub>2</sub>P-Phe). Wenn die Phosphonatgruppe jedoch perfluoriert wird, um eine permanent negativ geladene, hypervalente R-CF<sub>2</sub>-PF<sub>5</sub><sup>-</sup>-Gruppe zu erzeugen (siehe p-CF<sub>2</sub>PF<sub>5</sub><sup>-</sup>-Phe),<sup>[27]</sup> wird gegenüber der neutralen Phosphonatgruppe in *p*-CF<sub>2</sub>P-Phe eine Erhöhung der Hydrophobie ( $\alpha = 0.980$ ) beobachtet. Dies bestätigt, dass geringste Veränderungen im Fluorierungsmuster von Aminosäuren tatsächlich zu erheblichen Veränderungen in ihrer Hydrophobie führen und somit ihr Aggregationsverhalten beeinflussen.

Wir stellen hier eine neuartige, unverzerrte Hydrophobieskala vor, die auf der Clusterbindung von Aminosäuren in der Gasphase basiert. In den Reinraumbedingungen der Gasphase kann der entropische Beitrag durch Solvatisierung, der normalerweise zu hydrophoben Wechselwirkungen führt, vernachlässigt werden. Infolgedessen ähnelt diese Umgebung mit geringer Permittivität der eines dicht gepackten Proteinkerns. Typischerweise bilden hydrophobe Aminosäuren räumlich ausgedehntere Cluster, bei denen ihre unpolaren Seitenketten der niedrigen Permittivität der Gasphase ausgesetzt sind, während polare Aminosäuren kompakte Cluster bilden, um elektrostatische, intermolekulare Wechselwirkungen zu maximieren. Um eine quantitative Bewertung durchzuführen und sowohl natürliche als auch mehrere nichtnatürliche, fluorierte Aminosäuren zu klassifizieren, wurde ein Korrekturfaktor  $\alpha$  eingeführt, der ein Maß für die Abweichung vom isotropen Clusterwachstum darstellt. Die vorgestellte Methode ist ein allgemeingültiger Ansatz zur präzisen Bestimmung der intrinsischen und insbesondere unverzerrten Hydrophobie von Aminosäuren. Der Ansatz ermöglicht nicht nur die Klassifizierung von natürlichen Bausteinen, sondern auch die von synthetischen Verbindungen, deren Eigenschaften mit bekannten Methoden nur schwer oder überhaupt nicht vorhersagbar sind. Damit bietet unsere Methode ein wertvolles Hilfsmittel bei der Entwicklung von Peptiden, Proteinen und Wirkstoffen.



## Danksagung

Wir danken D. A. Thomas für das Korrekturlesen. R.C., J.R., B.K. und K.P. bedanken sich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung unter der Projektnummer 387284271-SFB 1349. M.T.B. bedankt sich für die Unterstützung durch die Alexander von Humboldt-Stiftung und für die Förderung durch die National Science Foundation (USA) unter dem Zuschuss CHE-1565941.

## Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

**Stichwörter:** Fluorierte Aminosäuren · Gasphase · Hydrophilie · Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie · Isotropes Wachstum

Zitierweise: Angew. Chem. Int. Ed. 2019, 58, 8216–8220 Angew. Chem. 2019, 131, 8299–8303

- a) G. D. Rose, R. Wolfenden, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1993, 22, 381-415; b) V. N. Uversky, J. R. Gillespie, A. L. Fink, Proteins Struct. Funct. Genet. 2000, 41, 415-427.
- [2] a) K. Yutani, K. Ogasahara, T. Tsujita, Y. Sugino, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 4441–4444; b) B. Tripet, K. Wagschal, P. Lavigne, C. T. Mant, R. S. Hodges, *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 377–402.
- [3] a) F. Chiti, N. Taddei, F. Baroni, C. Capanni, M. Stefani, G. Ramponi, C. M. Dobson, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2002, *9*, 137;
  b) U. I. M. Gerling, M. Salwiczek, C. D. Cadicamo, H. Erdbrink, C. Czekelius, et al., *Chem. Sci.* 2014, *5*, 819–830.
- [4] a) L. Young, R. L. Jernigan, D. G. Covell, *Protein Sci.* 1994, *3*, 717–729; b) R. G. Efremov, A. O. Chugunov, T. V. Pyrkov, J. P. Priestle, A. S. Arseniev, E. Jacoby, *Curr. Med. Chem.* 2007, *14*, 393–415.
- [5] a) C. C. Palliser, D. A. Parry, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2001, 42, 243–255; b) K. M. Biswas, D. R. DeVido, J. G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* 2003, 1000, 637–655.
- [6] a) J.-L. Fauchère, V. Pliska, *Eur. J. Med. Chem.* 1983, 18, 369–375; b) Y. Nozaki, C. Tanford, *J. Biol. Chem.* 1971, 246, 2211–2217.
- [7] G. Rose, A. Geselowitz, G. Lesser, R. Lee, M. Zehfus, *Science* 1985, 229, 834–838.
- [8] H. B. Bull, K. Breese, Arch. Biochem. Biophys. 1974, 161, 665– 670.

- [9] J. M. Kovacs, C. T. Mant, R. S. Hodges, *Biopolymers* 2006, 84, 283–297.
- [10] C. T. Mant, J. M. Kovacs, H. M. Kim, D. D. Pollock, R. S. Hodges, *Biopolymers* 2009, 92, 573–595.
- [11] J. L. Meek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980, 77, 1632-1636.
- [12] B. Tripet, D. Cepeniene, J. M. Kovacs, C. T. Mant, O. V. Krokhin, R. S. Hodges, *J. Chromatogr. A* 2007, 1141, 212–225.
- [13] C. Bleiholder, T. D. Do, C. Wu, N. J. Economou, S. S. Bernstein, et al., J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 16926–16937.
- [14] L. Li, C. Li, Z. Zhang, E. Alexov, J. Chem. Theory Comput. 2013, 9, 2126–2136.
- [15] C. Liu, J. C. Y. Le Blanc, B. B. Schneider, J. Shields, J. J. Federico, et al., ACS Cent. Sci. 2017, 3, 101–109.
- [16] a) G. von Helden, M. T. Hsu, N. Gotts, M. T. Bowers, J. Phys. Chem. 1993, 97, 8182–8192; b) D. E. Clemmer, M. F. Jarrold, J. Mass Spectrom. 1997, 32, 577–592.
- [17] V. Gabelica, A. A. Shvartsburg, C. Afonso, P. Barran, J. L. P. Benesch, et al., *Mass Spectrom. Rev.* 2019, https://doi.org/10. 1002/mas.21585.
- [18] a) C. K. Meng, J. B. Fenn, Org. Mass Spectrom. 1991, 26, 542–549; b) P. Nemes, G. Schlosser, K. Vékey, J. Mass Spectrom. 2005, 40, 43–49; c) T. D. Do, N. E. C. de Almeida, N. E. LaPointe, A. Chamas, S. C. Feinstein, M. T. Bowers, Anal. Chem. 2016, 88, 868–876.
- [19] C. Bleiholder, N. F. Dupuis, T. Wyttenbach, M. T. Bowers, *Nat. Chem.* 2011, 3, 172–177.
- [20] J. Seo, W. Hoffmann, S. Malerz, S. Warnke, M. T. Bowers, K. Pagel, G. von Helden, *Int. J. Mass Spectrom.* 2018, 429, 115–120.
- [21] S. C. Nanita, R. G. Cooks, Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 554– 569; Angew. Chem. 2006, 118, 568–583.
- [22] D.G. Isom, C.A. Castañeda, B.R. Cannon, E.B. García-Moreno, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2011, 108, 5260-5265.
- [23] A. Vulpetti, C. Dalvit, *Drug Discovery Today* 2012, *17*, 890–897.
  [24] L. M. Gottler, R. de la Salud Bea, C. E. Shelburne, A. Rama-
- moorthy, E. N. G. Marsh, *Biochemistry* **2008**, *47*, 9243–9250. [25] a) M. Salwiczek, E. K. Nyakatura, U. I. Gerling, S. Ye, B.
- Koksch, Chem. Soc. Rev. 2012, 41, 2135–2171; b) A. A. Berger,
  J. S. Voller, N. Budisa, B. Koksch, Acc. Chem. Res. 2017, 50, 2093–2103.
- [26] J. R. Robalo, S. Huhmann, B. Koksch, A. Vila Verde, *Chem* 2017, 3, 881–897.
- [27] S. Wagner, M. Accorsi, J. Rademann, Chem. Eur. J. 2017, 23, 15387–15395.

Manuskript erhalten: 7. Dezember 2018 Veränderte Fassung erhalten: 1. März 2019 Akzeptierte Fassung online: 8. April 2019 Endgültige Fassung online: 10. Mai 2019