

KONFORMAČNÍ STUDIE POLY- γ -BENZYL-L-GLUTAMÁTU METODOU VIBRAČNÍHO CÍRKULÁRNÍHO DICHROISMU

Pavčina Novotná¹, Marie Urbanová²

¹Ústav analytické chemie Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28, Praha 6-Dejvice

²Ústav fyziky a měřicí techniky, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28, Praha 6-Dejvice

E-mail: Novotnap@vscht.cz

Úvod

Polypeptidy jsou významné látky především díky jejich blízkému vztahu k proteinům. Kromě chemického složení jsou unikátní a různorodé vlastnosti proteinů dány především konfigurací jejich řetězce a pořadím a počtem aminokyselin v řetězci. Jedinečnou příležitostí, jak zkoumat vzájemné vztahy mezi těmito základními vlastnostmi určujícími funkci a strukturu proteinů, je studium syntetických polypeptidů, jako poly- γ -benzyl-L-glutamátu (PBLG).

Polypeptid PBLG vykazuje topologickou chiralitu. Jeho konformace a agregační stav jsou výrazně závislé na použitém rozpouštědle a koncentraci. Představuje tak velmi dobrý modelový systém pro studium biologicky významných interakcí v závislosti na použitém rozpouštědle a tím i na struktuře použité chirální matrice. Právě chiralita je důležitou vlastností charakterizující živé organismy. Biologicky významné molekuly jsou často chirální a jejich enantiomery se navíc mnohdy v přírodě vůbec nevyskytují. Také většina reakcí v lidském těle probíhá za účasti jednoho i ze stovek možných stereoizomerů. Stereospecifita takových reakcí je pak často založena právě na interakci chirálních látek a na ovlivňování jejich konformace. Sledování systémů, jako např. PBLG v různých rozpouštědlech, vede k bližšímu pochopení konformačních a agregačních změn přírodních polypeptidů či proteinů, což je jeden z prvních kroků k pochopení stereospecifických reakcí probíhajících v živých organismech.

Chirální molekuly absorbují v jiné míře levo- a pravotočivé cirkulárně polarizované záření. Cirkulární dichroismus je definován jako rozdíl absorbance vlevo a vpravo cirkulárně polarizovaného záření. Při použití záření v infračervené oblasti spektra dochází k přechodům mezi vibračními hladinami molekuly a jedná se o vibrační cirkulární dichroismus (VCD)¹.

Vlastnosti syntetických polypeptidů byly charakterizovány řadou fyzikálně-chemických metod. VCD nabízí alternativní pohled na PBLG s výhodami¹ oproti běžnějšímu elektronovému cirkulárnímu dichroismu (ECD) a infračervené (IČ) spektroskopii.

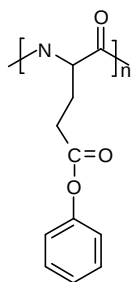
Pro konformační a agregační stav PBLG je důležitá především polarita a acidita rozpouštědla. V rozpouštědlech, jako trichlormethan, benzen či nitrobenzen, zaujímá PBLG α -helikální konformaci², která je stabilizována intramolekulárními vodíkovými můstky. Dochází zde k molekulární asociaci za vzniku agregátů. Roztok PBLG má pak z tohoto důvodu velmi velkou viskozitu – převládá zde interakce polymer-polymer nad interakcí polymer-rozpouštědlo. Možnost tvorby vodíkových můstků mezi polymerem a rozpouštědlem je zde tudíž minimální. Naopak, tvoří se intermolekulární vodíkové vazby typu „end to end“ (antiparalelní) a „side-by-side“ v nepolárním benzenu, benzylalkoholu a dioxanu a typu „head-to-tail“ v trichlormethanu^{3;4}. V asociátech si PBLG většinou ponechává svou nativní helikální konformaci. Po překročení určité kritické koncentrace dochází v těchto roztocích ke vzniku chirálních struktur, tzv. kapalných cholesterických krystalů⁵. Molekuly jsou v nich orientovány ve vrstvách, v nichž jsou osy molekul navzájem rovnoběžné, ale v každé vrstvě je směr os molekul oproti osám molekul v předchozí vrstvě pootočen. Tak vzniká helikální struktura – tzv. superhelix. Ta vykazuje vysokou optickou aktivitu⁵, která vysvětluje velmi silný signál ve VCD pozorovaný pro cholesterické krystaly¹⁰.

V kyselých rozpouštědlech, jako je trifluoroctová kyselina (TFA), naopak molekuly PBLG neasociují a PBLG nabývá konformace polyprolin II⁶. Velký význam mají především sekundární interakce mezi rozpouštědlem a polypeptidovým řetězcem⁶. Konformace polyprolin II byla dříve označována jako „random coil“, statistické klubko. ECD⁷ a VCD⁸ studie ale prokázaly, že se jedná o lokálně pravidelnou strukturu tvořenou levotočivými helikálními úseky. Metoda VCD se zde ukázala mnohem vhodnější k rozpoznávání struktury polyprolin II než ECD⁸.

V této práci jsou metodou VCD doplněnou o IČ absorpční spektroskopii charakterizovány jednotlivé zmíněné konformace, sledována agregace a hledány podmínky pro realizaci různých konformačních forem PBLG v roztoku.

Experimentální část

Pro tuto práci byl použit poly- γ -benzyl-L-glutamát (obr. 1) s průměrnou molekulovou hmotností $69\,000\text{ g.mol}^{-1}$ (Sigma), tedy polymer střední délky řetězce. K přípravě roztoků byla použita deuterovaná rozpouštědla trichlormethan-d1, trifluoroctová kyselina-d1, benzen-d6 a nitrobenzen-d5 (vše Sigma).



Obr. 1: Strukturní vzorec poly- γ -benzyl-L-glutamátu (PBLG)

Spektrální měření byla prováděna na spektrometru s Fourierovou transformací IFS-66/S (Bruker, Německo) ve spektrální oblasti $1800 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ s rozlišením 8 cm^{-1} . Spektra VCD jsou průměrem ze 6 bloků, každý měřený 20 minut, a jsou normována na jednotkovou hodnotu absorbance pásu amidu I. Před a po měření VCD byla změřena absorpční spektra z důvodu kontroly stálosti a homogenity studovaného vzorku. V některých uvedených spektrech byly vynechány určité spektrální oblasti z důvodu vysoké absorbance rozpouštědel, která by mohla vést ke vzniku nežádoucích artefaktů ve VCD spektru. Byly použity skládané kyvety tvořené okny z CaF_2 a teflonovou distanční folií o tloušťce $50 \mu\text{m}$ ($25 \mu\text{m}$ pro kapalně krystaly).

VCD signál byl korigován na nulovou linii, kterou představovala spektra příslušných rozpouštědel měřených za stejných podmínek jako roztoky vzorků. Absorpční spektra byla také korigována na signál rozpouštědla.

Roztoky PBLG v CDCl_3 , benzenu- d_6 , nitrobenzenu- d_5 a směsném rozpouštědle CDCl_3/TFA byly měřeny pro hmotnostní koncentraci $\rho = 30 \text{ g.l}^{-1}$, objemové zlomky TFA ve směsných rozpouštědlech měly hodnoty 0,05; 0,1; 0,15 a 0,20.

Kapalné krystaly byly připraveny z roztoku polypeptidu v benzenu- d_6 o hmotnostní koncentraci 50 g.l^{-1} . Vysoce viskózní roztok byl nanesen přímo na spodní okno kyvety (CaF_2) do prostoru vymezeného teflonovou folií, kde se odpařil zbytek rozpouštědla, aby byla dosažena koncentrace nutná k vytvoření krystalů, a poté byla kyveta sestavena běžným způsobem.

Výsledky a diskuse

Asociované formy PBLG

Na obr. 2 jsou VCD a absorpční spektra PBLG v CDCl_3 , benzenu- d_6 a nitrobenzenu- d_5 , která mají obdobný průběh – pozitivní VCD couplet v oblasti amidu I se středem u 1650 cm^{-1} ,

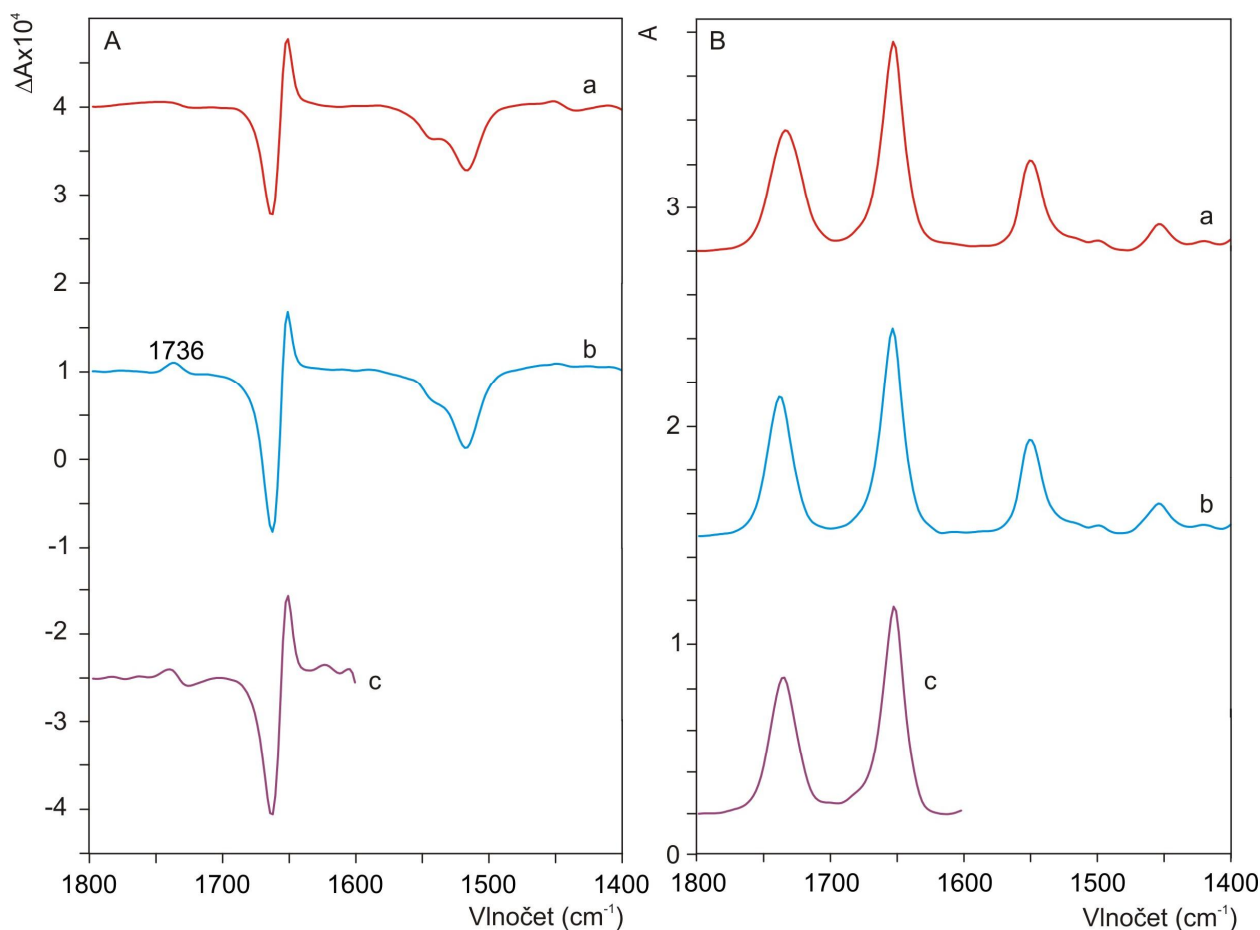
který je charakteristický pro α -helikální konformaci⁹. Vzhledem k citlivosti VCD spekter ke struktuře peptidů je možné toto pozorování interpretovat tak, že α -helix je základní sekundární strukturou PBLG v těchto roztocích. Nicméně jednotlivá spektra nejsou zcela totožná.

V benzenu-d6 je negativní signál coupletu v oblasti amidu I intenzivnější než v CDCl_3 . Zesílení intenzity negativního pásu je patrné i ze spektra PBLG v nitrobenzenu-d5. V roztocích benzenu-d6 a nitrobenzenu-d5 se objevuje nový pozitivní VCD signál u 1736 cm^{-1} , navíc je patrné i zesílení intenzity tohoto pásu v absorpčním spektru.

Zesílení intenzity negativního signálu coupletu amidu I oproti pozitivnímu signálu je patrné u všech tří roztoků a mohlo by být projevem interakce mezi šroubovicemi, neboť signál charakteristický pro α -helix vykazuje větší vyrovnanost obou pásů coupletu amidu I⁹. Jiná intenzita tohoto signálu v benzenu-d6 a nitrobenzenu-d5 ukazuje buď na jiný způsob agregace šroubovic než v roztoku CDCl_3 , nebo na výraznější agregaci, kterou je možno předpokládat i z mnohem viskóznějšího roztoku polypeptidu v benzenu-d6 než v CDCl_3 .

Při agregaci pravděpodobně dochází k mírné deformaci α -helikální kostry tvorbou intermolekulárních můstků mezi jednotlivými řetězci PBLG, která se odráží ve změně poměru intenzity obou pásů. V benzenu-d6 a nitrobenzenu-d5 je tato interakce ještě zesílena přítomností benzenových jader v rozpouštědle. Solvatační efekt benzenu-d6 a nitrobenzenu-d5 je tak jiný než CDCl_3 a pravděpodobně podporuje vznik π - π interakcí. Důsledkem těchto interakcí je i pozitivní VCD signál u 1736 cm^{-1} v obou spektrech a zesílení intenzity tohoto signálu v absorpčním spektru. Signál VCD u 1736 cm^{-1} byl pozorován dříve pro roztoky PBLG v benzenu-d6 a interpretován jako důsledek vlivu chirálního uspořádání polypeptidové matrice na C=O skupinu esteru v postranním řetězci polypeptidu¹⁰. Ve spektru PBLG v CDCl_3 tento signál není patrný. Benzylové kruhy v postranním řetězci PBLG jsou totiž z důvodu výše uvedené interakce více stabilizovány v roztocích obsahujících benzenová jádra než v CDCl_3 , nemohou již tedy volně rotovat kolem esterové vazby, což se projeví na zesílení jejího signálu¹⁰.

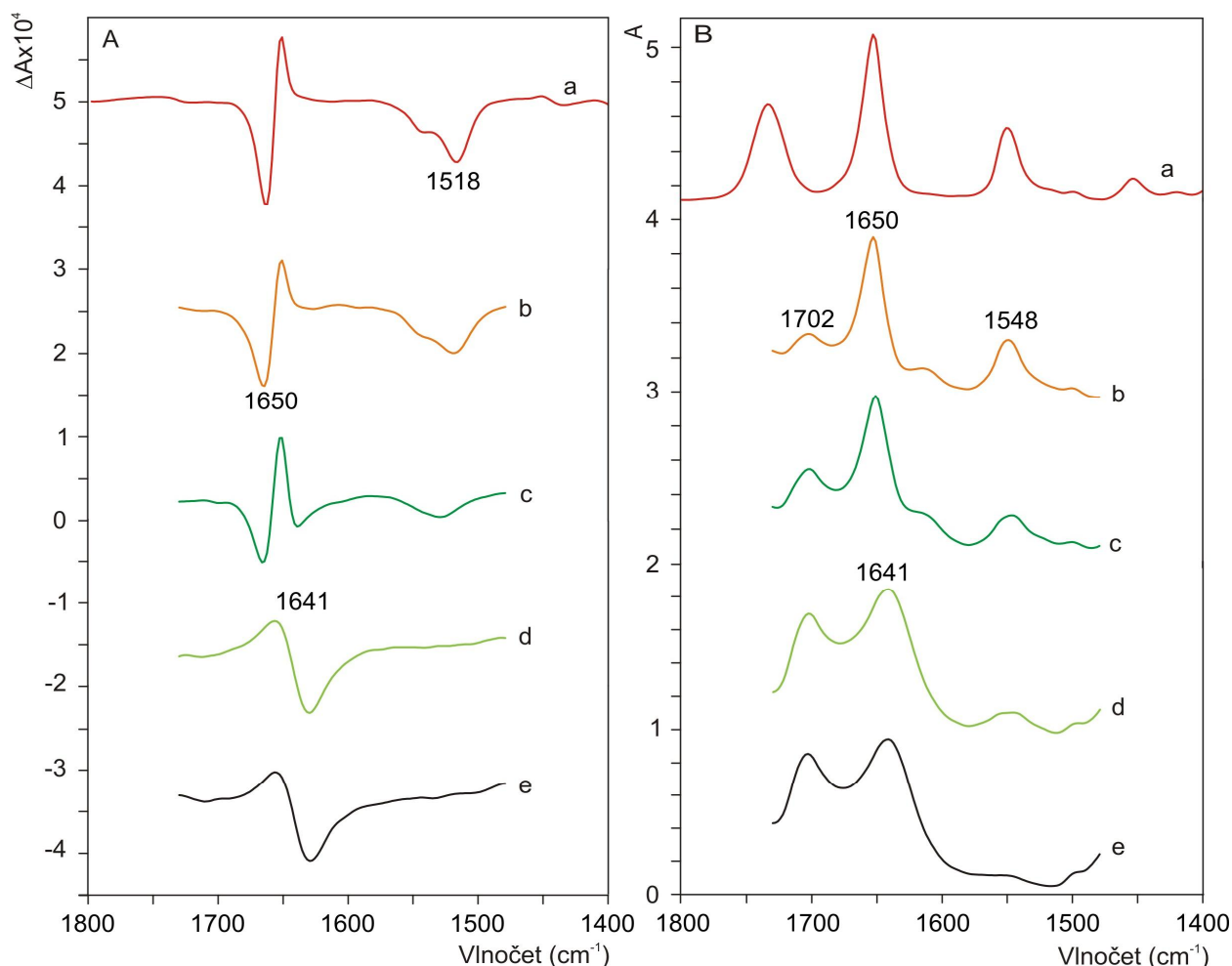
Důsledkem silnější agregace PBLG v benzenu-d6 než v CDCl_3 je i tvorba kapalných krystalů PBLG v benzenu-d6 při nižších koncentracích PBLG než v roztoku CDCl_3 .



Obr. 2: VCD (A) a absorpční (B) spektra PBLG v CDCl_3 (a), v benzenu- d_6 (b) a v nitrobenzenu- d_5 (c). Spektrální oblast $1620\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ byla u posledního spektra vynechána z důvodu vysoké absorpce nitrobenzenu- d_5 .

Závislost struktury PBLG na složení směsného rozpouštědla CDCl_3/TFA

Na obr. 3 jsou uvedena spektra PBLG v CDCl_3 a poté ve směsném rozpouštědle CDCl_3/TFA o různém obsahu TFA. S postupným zvyšováním obsahu kyseliny, dochází ke změnám jak v absorpčním, tak ve VCD spektru. Intenzita absorpčního pásu u 1548 cm^{-1} se s přidavkem kyseliny snižuje. Naopak přibližně současně narůstá intenzita pásu u 1702 cm^{-1} . Ve VCD spektrech lze ovšem pozorovat výraznější změny. Zvyšováním obsahu TFA v rozpouštědle do 10 obj.% dochází k vyrovnání intenzity pásů coupletu v oblasti amidu I, poté se při přidavku kyseliny na 15 obj.% změni znaménka pásů coupletu a pás se posune k nižším vlnovým – střed pásu z 1650 na 1641 cm^{-1} . Současně se posouvá i pás absorpčního spektra. Ke změnám dochází také v oblasti amidu II – intenzita VCD pásu u 1518 cm^{-1} se postupně snižuje.



Obr. 3: VCD (A) a absorpční (B) spektra PBLG v CDCl_3 (a), ve směsném rozpouštědle CDCl_3/TFA – 5 obj.% TFA (b), 10 obj.% TFA (c), 15 obj.% TFA (d) a 20 obj.% TFA (e). Některé spektrální oblasti byly u spekter pro PBLG ve směsném rozpouštědle vynechány, z důvodu vysoké absorpce TFA.

Změny intenzit absorpčních pásů 1548 a 1702 cm^{-1} lze vysvětlit následovně. V obou případech se jedná o vibrace volných koncových skupin řetězce polypeptidu, pás u 1548 cm^{-1} je přiřazen asymetrické vibraci COO^- , pás u 1702 cm^{-1} pak vibraci C=O nedisociované skupiny COOH . S přidavkem kyseliny roste kyselost roztoku a tudíž ubývá volných disociovaných skupin COO^- , naopak roste počet skupin COOH , odtud také proporcionální změna intenzity obou pásů.

Vyrovnění intenzity coupletu amidu I ve VCD spektru může být spojeno s klesající intenzitou agregace jednotlivých šroubovic. Mnohem více polární a kyselé rozpouštědlo TFA zabráňuje asociaci tím, že interakcí TFA – PBLG konkuruje tvorbě intermolekulárních vodíkových můstků mezi molekulami PBLG. Tyto změny lze pozorovat i na základě

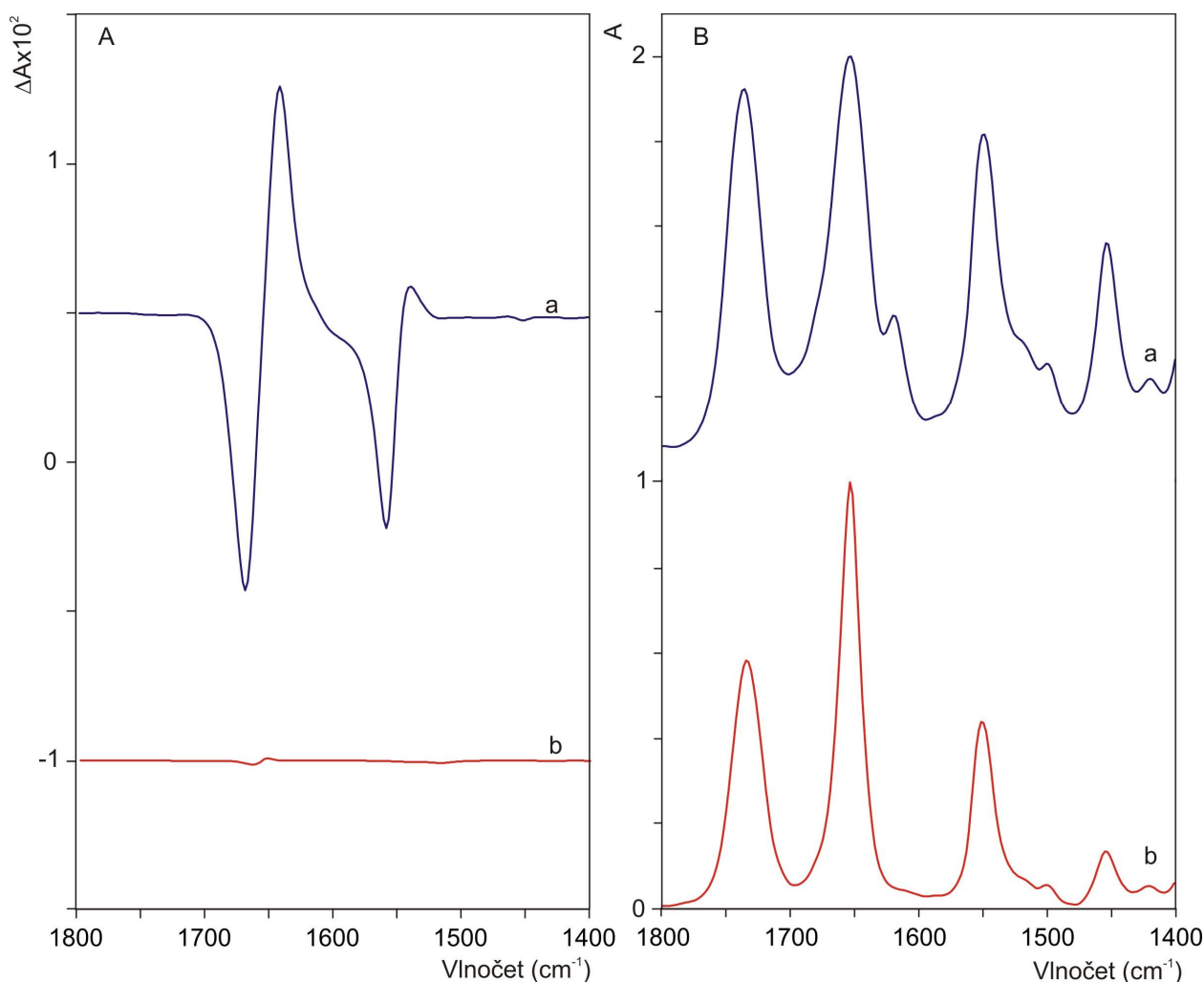
konzistence vzorku. Při obsahu 10 obj.% TFA v rozpouštědle je viskozita vzorku malá, nedochází tedy pravděpodobně k výrazné molekulární asociaci PBLG a pozorovaná intenzita negativního a pozitivního pásu coupletu je stejná. To, že vyrovnaní obou pásů není způsobeno pouhou konkurencí spektrálních pásů struktury polyprolin II a α -helix, je patrné z absorpčního spektra, kde nedochází k postupnému posunu polohy pásu amidu I. Jeho poloha se mění skokově z 1650 na 1641 cm^{-1} až se změnou znamének coupletu.

Při obsahu kyseliny 15 obj.% TFA v rozpouštědle dochází ke změně znamének pásů coupletu amidu I a k posunu celého tohoto pásu. Sledované změny lze vysvětlit změnou konformace z pravotočivé α -helikální na strukturu polyprolin II charakterizovanou jako lokální levotočivou šroubovici⁸. Protože se lokálně mění smysl stáčení šroubovice z pravotočivé na levotočivou, mění se zcela i znaménka VCD pásů v opačná. Posun středu coupletu je taktéž charakteristický pro konformaci polyprolin II¹¹. Současný posun pásu absorpčního spektra je způsoben změnou dihedrálních úhlů ve struktuře polypeptidu. VCD spektra jsou pro obsah kyseliny 15 a 20 obj.% téměř totožná, z toho je možno usoudit, že již k žádným konformačním ani agregačním změnám nedochází. Postupným přidáváním TFA se navíc snižuje intenzita pásu v oblasti amidu II. Tento efekt je opět v souladu s tvarem spektra pro strukturu polyprolin II⁸.

Získané výsledky tedy interpretujeme tak, že postupným zvyšováním obsahu TFA v roztoku PBLG v CDCl_3 do 10 obj.% nejprve přestanou jednotlivé šroubovice agregovat a výrazně se sníží viskozita roztoku. V rozmezí obsahu kyseliny 10–15 obj.% dojde k výrazné konformační změně – pravotočivá šroubovice se změní na strukturu polyprolin II. Dalším přidávkem TFA do 20 obj.% již k žádným konformačním ani agregačním změnám vzorku nedochází.

Kapalné krystaly

Na obr. 4 je uvedeno VCD a absorpční spektrum kapalných krystalů PBLG v benzenu- d_6 a pro srovnání i spektrum PBLG v CDCl_3 , které bylo již uvedeno na obr. 1. Pro srovnání intenzit signálů obou forem PBLG je ve VCD spektru zachováno měřítko, které odpovídá intenzitě VCD pásů kapalných krystalů. Spektra kapalných krystalů jsou zde uvedena bez odečtu rozpouštědla, neboť prakticky nelze určit míru jeho absorpce v tomto systému.



Obr. 4: VCD (A) a absorpční (B) spektrum PBLG v benzenu-d₆ nad kritickou koncentrací, při níž se tvoří kapalně krystalové fáze (a), pro srovnání je ve stejném měřítku uvedeno VCD (A) a absorpční (B) spektrum PBLG v CDCl₃ (b).

Intenzita VCD signálu kapalných krystalů při srovnatelných hodnotách absorpce je asi stonásobná než u všech ostatních naměřených spekter. Opět je však pozorován pozitivní VCD couplet v oblasti amidu I, který je charakteristický pro α -helikální konformaci. Nelze zde již pozorovat signál u 1736 cm⁻¹ typický pro vibraci C=O. Kapalně krystalové fáze totiž obsahují velmi malé množství rozpouštědla, které je pravděpodobně imobilizováno ve struktuře superhelix, která vzniká agregací jednotlivých šroubovic polypeptidu. Nedochází tak již k tak intenzivnímu propojení mezi jednotlivými šroubovicemi pomocí π - π interakcí. To vede k opětovnému uvolnění esterové funkční skupiny a tak k výraznému snížení intenzity tohoto pásu ve spektru.

Závěr

Výsledky získané v předkládané práci jsou shrnuty do následujících bodů.

- (i) Jasně se prokázalo, že metoda VCD je velmi citlivou metodou na rozpoznávání jak změn v sekundární struktuře PBLG, tak i jemnějších rozdílů v agregačních stavech. Ve VCD spektru byly ukázány různé agregační stavy PBLG – od specificky organizovaného v benzenu-d₆, který vede až ke vzniku kapalných krystalů, přes slabší agregaci v CDCl₃, až po dispergované šroubovice polypeptidu ve směsném rozpouštědle CDCl₃/TFA při 10 obj.% TFA. Toto pozorování odpovídá i konzistenci měřených roztoků.
- (ii) Poprvé byla metodou VCD ukázána závislost sekundární struktury PBLG na složení směsného rozpouštědla CDCl₃/TFA. Ve VCD spektrech byly pozorovány charakteristické pásy v oblasti amidu I pro formy α -helix a polyprolin II. Ke zcela jednoznačnému přechodu mezi oběma formami, jejichž VCD spektra se v oblasti amidu I a II výrazně liší, dochází v rozmezí 10-15 obj.% TFA v rozpouštědle.
- (iii) Bylo pozorováno VCD spektrum kapalných krystalů PBLG v benzenu-d₆, které je charakteristické vysokou intenzitou jednotlivých VCD pásů. Tato tematika však bude kvůli své komplexnosti předmětem dalšího studia, neboť postup pro přípravu vzorků kapalných krystalů vhodných pro měření VCD spekter je třeba dále optimalizovat.

Poděkování

Tato práce byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (MSM 6046137307).

P.N. děkuje za pomoc při počátečních měřeních VCD spekter Ondřeji Julínkovi a Tomáši Krupinskému.

Literatura

1. Urbanová M., Maloň P. v knize: *Analytical methods in Supramolecular Chemistry* (Schalley C., Ed.) Wiley-VCH, Weinheim 2007.
2. Pauling L., Corey R.B.: *P. Natl. Acad. Sci. USA* 37, 241 (1951).
3. Chakrabarti S., Miller W.G.: *Biopolymers* 23, 719 (1984).
4. Torii T., Yamashita T., Horie K.: *Eur. Polym. J.* 29, 1265 (1993).
5. Patel D.L., Dupre D.B.: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 53, 323 (1979).
6. Elias H. G.: *Int. J. Polym. Mater.* 4, 209 (1976).

7. Berova N., Nakanishi K., Woody R.W.: *Circular Dichroism. Principles and Applications*. Wiley-VCH 2000.
8. Dukor R. K., Keiderling T.A.: *Biopolymers* 31, 1747 (1991).
9. Yasui S. C., Keiderling T.A.: *Biopolymers* 25, 5 (1986)
10. Palivec L.: Disertační práce. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze 2006.