

STUDIUM INDUKOVANÉHO CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU V KOMPLEXECH PORFYRINŮ A POLY(L-GLUTAMOVÉ KYSELINY)

ONDŘEJ JULÍNEK^{a*} a MARIE URBANOVÁ^b

^a Ústav analytické chemie a ^b Ústav fyziky a měřicí techniky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
julineko@vscht.cz, marie.urbanova@vscht.cz

Došlo 31.5.05, přepracováno 13.9.06, přijato 19.10.06.

Klíčová slova: cirkulární dichroismus, porfyryny, polypeptidy, komplexy porfyřinů, indukovaný cirkulární dichroismus, ternární komplexy, chirální paměť

Úvod

Porfyryny jsou látky, které se zúčastňují biologicky důležitých pochodů. Jsou to ale také sloučeniny významné z hlediska praktického využití, známé je např. jejich použití ve fotodynamické terapii při léčbě rakoviny¹. Cílem této práce bylo ověřit, zda dochází k přenosu chirální informace z matrice prostřednictvím kationtového porfyřinu na porfyřin aniontový.

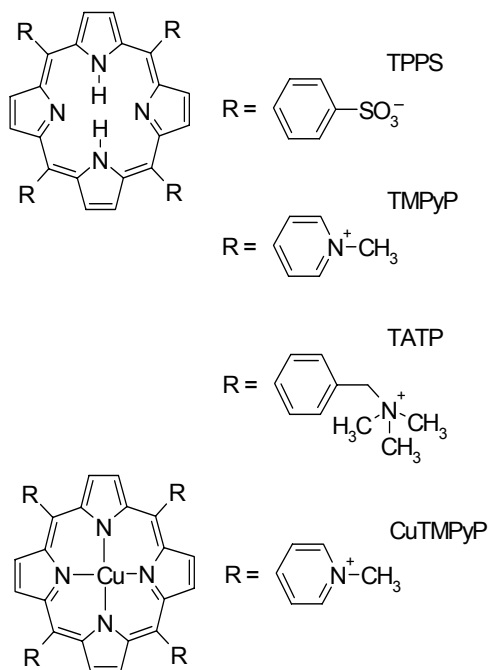
Jako matrice byla zvolena poly(L-glutamová kyselina) (PLGA), jejíž konformaci lze měnit změnou pH roztoku^{2,4}. Dobře definované α -helikální konformace je možné dosáhnout nastavením pH na dostatečně nízkou hodnotu (pH 3–5), při vyšších hodnotách pH přechází PLGA do konformace označované historicky jako nahodilé klubko, nově jako PP-II, která je blízká rozvolněné levotočivé šroubovici⁵ typické pro jednu ze struktur poly(L-prolinu).

Vhodným nástrojem pro zjišťování přenosu chirální informace je spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu (ECD), pomocí níž je možné sledovat jak konformaci PLGA matrice v UV oblasti, tak případný vznik indukovaného cirkulárního dichroismu porfyřinů v oblasti Soretova pásu ve viditelné části spektra. Indukovaný cirkulární dichroismus může být vyvolán pro původně achirální porfyřin jeho vazbou na chirální matrici nebo chirálním uspořádáním ve vzniklých komplexech.

Pomocí ECD (cit. 6–8) a vibračního cirkulárního dichroismu^{9,10} bylo ukázáno, že za vhodných podmínek dochází k interakci PLGA s kationtovými porfyřiny. K při-

mé vazbě mezi PLGA a aniontovým porfyřinem nedochází v důsledku odpuzivých elektrostatických sil mezi záporně nabitými karboxylovými skupinami PLGA a záporně nabitým porfyřinovým derivátem¹¹. Tato vazba je však možná prostřednictvím kationtového porfyřinu, který slouží jako mezičlánek odstiňující elektrostatický vliv PLGA a umožňující aniontovému porfyřinu vytvořit chirální konjugát. Tento efekt byl zatím pozorován při použití měďnatého derivátu 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porfyřinu (CuTMPyP) jakožto kationtového a 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyřinu (TPPS) jakožto aniontového porfyřinu, kdy vznikají vysoce stabilní supramolekulární komplexy vykazující molekulární paměť^{12,13}. Vzniklé komplexy se stávají nezávislé na konformaci matrice a svou strukturu nemění ani při výrazné změně pH a iontové síly roztoku^{12,13}. Důležitou roli při vzniku vyšších molekulárních struktur hrají, kromě pH a iontové síly, další podmínky, jako je teplota a koncentrace látek, zejména poměr koncentrací polypeptidu a porfyřinu [P]/[D], kde [P] a [D] jsou látkové koncentrace polypeptidu a porfyřinu¹².

V této práci byla studována indukce cirkulárního dichroismu při interakci porfyřinů s polypeptidovou matricí mající konformaci α -helikální nebo PL-II. Kromě kationtového porfyřinu CuTMPyP byly použity další dva kationtové porfyřiny: 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-



Obr. 1. Struktura použitých porfyřinových derivátů

* Ondřej Julínek se s touto prací úspěšně zúčastnil soutěže O cenu firmy Merck 2005 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

-yl)porfin-tetrachlorid (TMPyP) a 5,10,15,20-tetrakis{4-[(trimethylamonio)methyl]fenyl}porfyrin-tetrachlorid (TATP). Dále bylo ověřeno chování ternárního komplexu PLGA+CuTMPyP+TPPS a dosažené výsledky byly srovnány se systémy PLGA + TMPyP + TPPS a PLGA + TATP + TPPS s cílem potvrdit nebo vyvrátit vznik podobných konjugátů pro tyto další porfyrinové deriváty.

Experimentální část

Materiály a metody

Jako chirální matrice byla použita kyselina poly(L-glutamová) ve formě sodné soli s průměrnou molekulovou hmotností $13\,000\text{ g mol}^{-1}$ (Sigma). Jako aniontový porfyrin byl zvolen 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfín ve formě sodné soli (TPPS) (Sigma). Jako kationtové porfyriny byly zvoleny 5,10,15,20-tetrakis{4-[(trimethylamonio)methyl]fenyl}porfyrin-tetrachlorid (TATP, cit.¹⁴), 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porfín-tetrachlorid (TMPyP) (Porphyrin Systems) a jeho měďnatý derivát (CuTMPyP) ve formě chloridu, který byl připraven na Ústavu analytické chemie rutinní metalací¹⁵. Struktura použitých porfyrinů je znázorněna na obr. 1.

Spektra ECD byla měřena na spektrofotometru J-810 Jasco, s rozlišením $0,5\text{ nm}$, časovou konstantou 1 s a rychlostí záznamu 100 nm s^{-1} . Koncentrace matrice PLGA byla $c(\text{PLGA}) = 1 \cdot 10^{-3}\text{ mol l}^{-1}$, vztažena na aminokyselinový zbytek, v případě ternárního komplexu při pH 3,6 byla tato koncentrace $c(\text{PLGA}) = 2 \cdot 10^{-4}\text{ mol l}^{-1}$. Koncentrace porfyrinu byla dána požadovaným poměrem $[\text{P}]/[\text{D}]$ látkových koncentrací PLGA a porfyrinu.

Výsledky a diskuse

Konformace PLGA ve vodném prostředí byla sledována pomocí ECD v UV oblasti při $180\text{--}250\text{ nm}$. V kyselém prostředí PLGA poskytuje ECD spektrum s kladným maximem u 192 nm a zápornými maximy u 209 a $222,5\text{ nm}$ (obr. 2, spektrum 1). Tento spektrální průběh je charakteristický pro α -helikální konformaci. Při pH 9 PLGA poskytuje ECD spektrum se záporným maximem u $196,5\text{ nm}$, které je charakteristické pro konformaci PL-II (obr. 2, spektrum 2).

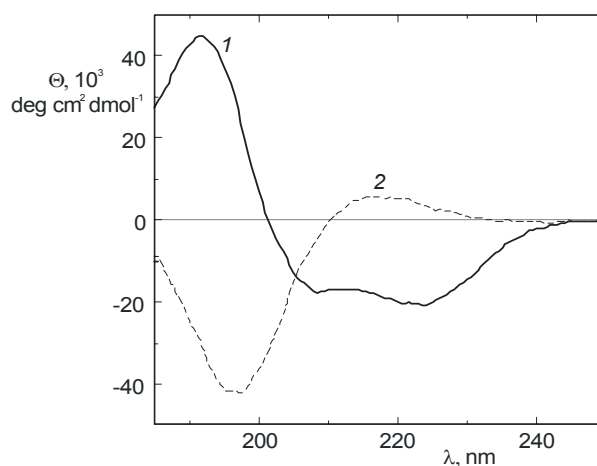
Vznik makromolekulárního komplexu mezi α -helikální PLGA a kationtovým porfyrinem se projevuje indukovaným cirkulárním dichroismem (obr. 3) původně achiálního porfyrinu.

Při pH 9, kdy se matrice PLGA nachází v konformaci PP-II, nebyl v roztocích PLGA a kationtového porfyrinu změřen žádný ECD signál v Soretově oblasti, který by odpovídal chirálnímu uspořádání porfyrinů; v oblasti maxim absorpčních pásů je pozorován pouze vyšší šum.

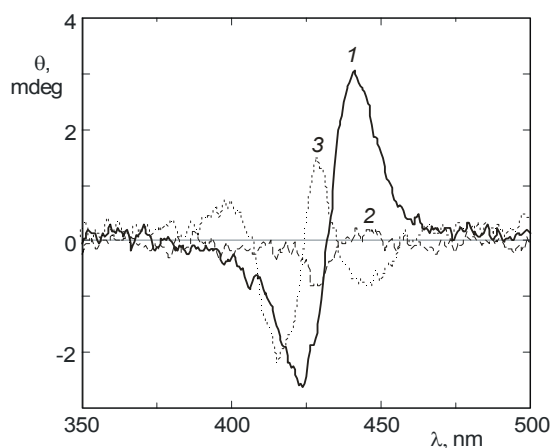
Zatímco u binárních směsí kationtových porfyrinů a matrice PLGA mající α -helikální konformaci byl pozoro-

rován dobře reprodukovatelný signál ECD v oblasti absorpčních Soretových pásů kationtových porfyrinů, v případě konformace PP-II se spektrum ECD pohybuje na úrovni šumu, který je způsobený vysokou absorpcí porfyrinu v této oblasti vlnových délek. Z toho usuzujeme, že indukce optické aktivity je podmíněna konformací matrice, nikoli pouhou vazbou porfyrinu na chirální matrici, a dochází tedy k přenosu chirální informace z matrice na porfyrinovou část komplexu.

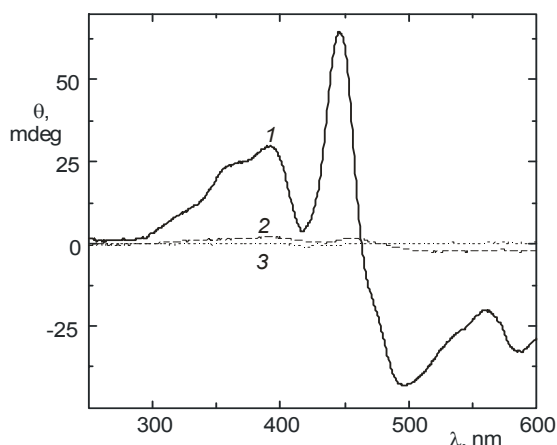
Vznik ternárních komplexů byl studován pro obě konformace polypeptidové matrice. Titrace binárních komplexů PLGA a kationtového porfyrinu aniontovým porfyrinem TPPS při pH 9, kdy polypeptidová matrice má konformaci PP-II, nevede ke vzniku indukovaného cirkulárního dichroismu. Odtud plyne, že ke vzniku ternárního chirálního komplexu za těchto podmínek nedochází.



Obr. 2. ECD spektrum PLGA; pH 3,75 (1), pH 9 (2)



Obr. 3. ECD spektra komplexu PLGA s kationtovými porfyriny; $[\text{P}]/[\text{D}] = 50$, pH 4,5; PLGA-CuTMPyP (1), PLGA-TMPyP (2), PLGA-TATP (3)



Obr. 4. ECD spektra ternárních komplexů PLGA-kationtový porfyrin-TPPS; $c(\text{PLGA}) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $c(\text{kationtový porfyrin}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, pH 3,6; poměr $[\text{TPPS}]/[\text{kationtový porfyrin}] = 1:1$. Kationtový porfyrin: CuTMPyP (1), TMPyP (2), TATP (3)

Další spektrální studie vzniku ternárních komplexů byla provedena pro všechny tři kationtové porfyriny při pH 3,6, kdy se polypeptidová matrice nachází v α -helikální konformaci, a při koncentracích $c(\text{PLGA}) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $c(\text{kationtový porfyrin}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 4). Tyto podmínky se ukázaly pro vznik komplexu optimální¹². Při použití kationtových porfyrinů TMPyP a CuTMPyP se pozoruje zřetelné spektrum ECD, přičemž indukovaná optická aktivita vzniklého komplexu je přibližně 30krát vyšší u měďnatého porfyrinu. To potvrzuje existenci vysoce uspořádaných stabilních supramolekulárních komplexů mezi molekulami CuTMPyP a TPPS (cit.¹³). Ze spekter na obr. 4 je zřejmé, že za stejných podmínek dochází k přenosu chiralitě také prostřednictvím porfyrinu TMPyP. Indukovaná optická aktivita je však v tomto případě výrazně menší než v případě měďnatého porfyrinu CuTMPyP. TATP za daných podmínek žádné indukované chirální uspořádání aniontového porfyrinu v komplexu neumožňuje.

Závěr

Pomocí spektroskopie cirkulárního dichroismu v UV a viditelné oblasti byly studovány podmínky přenosu chirální informace z chirální matrice na původně achirální kationtové a aniontové porfyrinové deriváty. Byly nalezeny optimální podmínky pro vznik chirálního komplexu kationtového a aniontového porfyrinu s uspořádáním porfyrinových jednotek vycházejících z geometrie matrice. Pro binární komplexy byl prokázán přenos chirální infor-

mace z α -helikálně uspořádané matrice kyseliny polyglutamové na tři kationtové porfyriny CuTMPyP, TMPyP a TATP. V případě, že se polyglutamová kyselina nachází v konformaci PP-II, se žádný signál indukovaného cirkulárního dichroismu nepozoruje a tedy porfyrinové molekuly jsou navázány neuspořádaně.

U ternárních směsí polyglutamové kyseliny, aniontového porfyrinu TPPS a kationtového porfyrinu bylo zjištěno, že optimálním kationtovým porfyrinem pro vznik chirálního ternárního komplexu na polyglutamové matrici je metalovaný derivát CuTMPyP. Při použití nemetalovaného porfyrinu TMPyP chirální ternární komplex také vzniká, intenzita cirkulárně dichroických pásů je však řádově nižší.

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci projektů MSM 6046137307 a OC-135.

LITERATURA

1. Sternberg E. D., Dolphin D., Bruckner C.: *Tetrahedron* 54, 4151 (1998).
2. Fasman G. D., Lindblow C., Bodenheimer E.: *Biochemistry* 3, 155 (1964).
3. Olander D. S., Holtzer A.: *J. Am. Chem. Soc.* 90, 4549 (1968).
4. Nagasawa M., Holtzer A.: *J. Am. Chem. Soc.* 86, 538 (1963).
5. Dukor R. K., Keiderling T. A.: *Biopolymers* 31, 1747 (1991).
6. Ikeda S., Nezu T., Gotthold E.: *Biopolymers* 31, 1257 (1991).
7. Nezu T., Ikeda S.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 66, 18 (1993).
8. Aoudia M., Rodgers M. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 119, 9063 (1997).
9. Urbanová M., Setnička V., Král V., Volka K.: *Biopolymers* 60, 307 (2001).
10. Palivec L., Urbanová M., Volka K.: *J. Peptide Sci.* 11, 536 (2005).
11. Purrello R., Scolaro L. M., Bellacchio E., Gurrieri S., Romeo A.: *Inorg. Chem.* 37, 3647 (1998).
12. Purrello R., Raudino A., Monsù Scolaro L., Loisi A., Bellacchio E., Lauceri R.: *J. Phys. Chem., B* 104, 10900 (2000).
13. Lauceri R., Raudino A., Scolaro L. M., Micali N., Purrello R.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 894 (2002).
14. Kubát P., Lang K., Anzenbacher P., Jursíková K., Král V., Ehrenberg B.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 2000, 933.
15. Pasternack R. F., Spiro E. G., Tlach M.: *J. Inorg. Nucl. Chem.* 36, 599 (1974).

O. Julínek^a and M. Urbanová^b (^a *Department of Analytical Chemistry and* ^b *Department of Physics and Measurements, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic*): **The Study of Induced Circular Dichroism in the Porphyrin-Poly(L-glutamic acid) Complexes**

The formation conditions for the binary complexes composed of poly(glutamic acid) and cationic porphyrins 5,10,15,20-tetrakis{4-[(trimethylammonio)methyl]phenyl}porphyrin tetrachloride (TATP), 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-pyridinium-4-yl)porphyrin (TMPyP) and its Cu(II)

derivative (CuTMPyP), and the ternary complexes composed of poly(glutamic acid), the same cationic porphyrins TATP, TMPyP and CuTMPyP and anionic porphyrin 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin were studied by electronic circular dichroism spectroscopy. The binary chiral complexes are formed if any of the three cationic porphyrins is used and the polypeptidic matrix possesses the α -helical structure. The ternary chiral complexes are formed if the matrix exhibits α -helical structure and cationic porphyrins TMPyP or CuTMPyP are used. When the metal porphyrin is used, the intensity of circular dichroism bands in spectrum is one order higher.