

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

PAVLÍNA NOVOTNÁ^{a*} a MARIE URBANOVÁ^b

^a Ústav analytické chemie, ^b Ústav fyziky a měřicí techniky, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
pavlina.novotna@vscht.cz

Došlo 5.5.09, přijato 25.1.01.

Klíčová slova: poly(γ -benzyl-L-glutamát), konformace, vibrační cirkulární dichroismus

Úvod

Polypeptidy jsou významné látky zejména díky jejich blízkému vztahu k proteinům. Kromě chemického složení jsou unikátní a různorodé vlastnosti proteinů dány především terciální a sekundární strukturou jejich řetězce a pořadím a počtem aminokyselin v řetězci. Polypeptid poly(γ -benzyl-L-glutamát) (PBLG) je rozpustný v organických rozpouštědlech, je chirální a jeho konformace a agregační stav jsou výrazně závislé na použitém rozpouštědle a koncentraci roztoku. Představuje tak velmi dobrou modelovou matici 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 funkce je chiralitou určena. Sledování systémů, jako např. PBLG v různých rozpouštědlech, vede k bližšímu pochopení konformačních a agregačních změn přírodních polypeptidů či proteinů.

Chirální molekuly absorbují v různé míře levotočivé 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 jde tedy o vibrační cirkulární dichroismus (VCD)¹. Intenzita signálu VCD je běžně o 4–6 řádů nižší než příslušná absorpce.

Přestože byly vlastnosti syntetických polypeptidů charakterizovány řadou fyzikálně-chemických metod, nabízí VCD alternativní pohled na PBLG s výhodami proti běžnějšímu elektronovému cirkulárnímu dichroismu

(ECD), infračervené (IČ) spektroskopii a dalším metodám. Výhody metody VCD jsou diskutovány v souborných zpracováních tématu^{1,2}.

Pro konformační a agregační stav PBLG je důležitá polarita a kyselost rozpouštědla. V rozpouštědlech, jako chloroform, benzen či nitrobenzen, zaujímá PBLG α -helikální konformaci³, která je stabilizována intramolekulárními vodíkovými můstky. Tvoří se také intermolekulární vodíkové vazby^{4,5} a molekuly tak asociují za vzniku agregátů. Roztok PBLG má pak z tohoto důvodu velmi vysokou viskozitu – převládá interakce polymer-polymer nad interakcí polymer-rozpouštědlo. Po překročení kritické koncentrace vznikají v těchto roztocích chirální struktury, tzv. cholesterolické kapalně krystaly⁶. Molekuly jsou ve vrstvách orientovány takovým způsobem, že jejich osy jsou rovnoběžné, ale v každé vrstvě je osa molekul oproti osám molekul v předchozí vrstvě pootočená. Tak vzniká helikální struktura – superhelix, vykazující vysokou optickou aktivitu⁶, která vysvětluje velmi silný signál VCD pozorovaný u cholesterolických krystalů.

V silně kyselých rozpouštědlech, jako je trifluoroctová kyselina (TFA), naopak molekuly PBLG neasociují a PBLG nabývá konformace polyprolinu II (PPII)⁷. Velký význam zde mají především sekundární interakce mezi rozpouštědlem a polypeptidovými řetězci⁷. Konformace PPII byla dříve označována jako statistické klubko (random coil). ECD² a VCD⁸ studie prokázaly, že jde o lokálně pravidelnou strukturu tvořenou levotočivými úseky helixu.

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

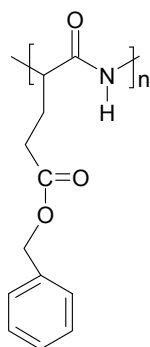
Experimentální část

Materiály a metody

Pro tuto práci byl použit poly(γ -benzyl-L-glutamát) (obr. 1) s průměrnou molekulovou hmotností 69 000 (Sigma), tedy polymer střední délky řetězce. K přípravě roztoků byla použita deuterovaná rozpouštědla chloroform (CDCl₃) (Isosar), benzen (C₆D₆) (Isosar) a nitrobenzen (C₆D₅NO₂) (Sigma), a nedeuterovaná rozpouštědla chloroform (Lachner) a trifluoroctová kyselina (Penta).

Spektrální měření byla prováděna na infračerveném spektrometru s Fourierovou transformací IFS-66/S (Bruker, Německo) v oblasti 1800–1400 cm⁻¹ s rozlišením 8 cm⁻¹. Postup měření na tomto přístroji a nastavení parametrů měření byly popsány již dříve^{9,10}. Spektra VCD jsou průměrem ze 6 bloků, každý měřený 20 minut. Před a po měření VCD byla změřena absorpční spektra pro kontrolu

* Pavlína Novotná získala 1. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2009 za nejlepší studentskou práci v oboru analytická chemie.

Obr. 1. Strukturální vzorec poly(γ -benzyl-L-glutamátu)

stálosti a homogenity studovaného vzorku. V některých uvedených spektrech byly vynechány spektrální oblasti s vysokou absorbcí rozpouštědel, která vede u slabých signálů VCD ke vzniku nežádoucích artefaktů kvůli nedostatečné energii dopadající na detektor. VCD spektra byla korigována na nulovou linii, kterou představovala spektra příslušných rozpouštědel měřených za stejných podmínek jako roztoky vzorků. Absorpční spektra byla také korigována na signál rozpouštědla.

Byly použity skládané kyvety tvořené okny z CaF_2 a teflonovou distanční fólií o tloušťce 50 μm (25 μm pro kapalně krystalů).

Příprava roztoků

Roztoky PBLG v CDCl_3 , CHCl_3 , C_6D_6 , $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$ a směsném rozpouštědle CHCl_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. Kapalně krystalů byly připraveny z roztoku polypeptidu v C_6D_6 o koncentraci 50 g l^{-1} . V tomto případě byl vysoce viskózní roztok nanášen přímo na spodní okno kyvety do prostoru vymezeného teflonovou fólií, kde se odpařil zbytek rozpouštědla, a tak byla dosažena koncentrace nutná k vytvoření krystalů. Potom byla kyveta sestavena běžným způsobem.

Výsledky a diskuse

Asociované formy PBLG

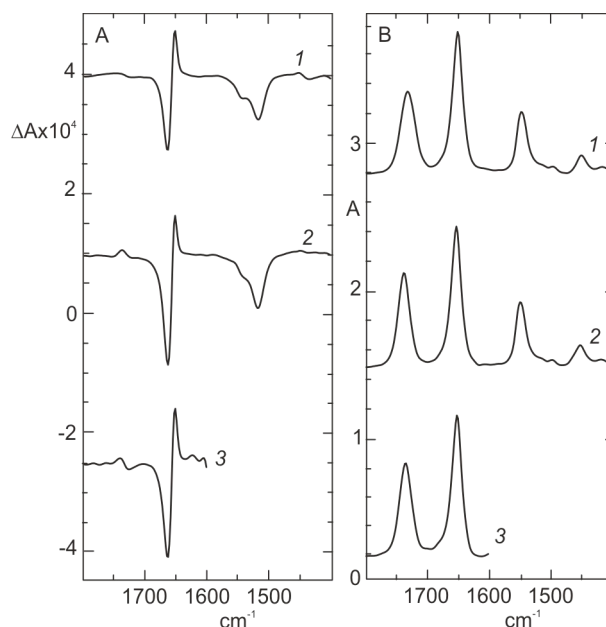
Na obr. 2 jsou VCD a absorpční spektra PBLG v CDCl_3 , C_6D_6 a $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$. Přes některé odlišnosti mají spektra obdobný průběh – pozitivní VCD couplet v oblasti amidu I se středem u 1650 cm^{-1} , který je charakteristický pro konformaci α -helixu¹¹. Vzhledem k citlivosti spekter VCD na strukturu^{1,2} mají pozorované spektrální odchylky své strukturální příčiny, které je možné interpretovat:

V C_6D_6 je negativní signál coupletu v oblasti amidu I

intenzivnější než v CDCl_3 . Zesílení tohoto pásu je patrné i ve spektru PBLG v $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$. V roztocích C_6D_6 a $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$ se objevuje nový pozitivní VCD signál při 1736 cm^{-1} , navíc je patrné i zesílení intenzity tohoto pásu v absorpčním spektru.

Větší intenzita negativního signálu coupletu amidu I ve srovnání s pozitivním signálem je patrná u všech tří roztoků a je pravděpodobně projevem interakce mezi šroubovicemi, neboť signál charakteristický pro neporušený α -helix ukazuje na vyrovnanost obou pásů coupletu⁹. Zvýšená intenzita záporného signálu pro roztoky v C_6D_6 a $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$ ukazuje buď na jiný způsob agregace šroubovic než v roztoku CDCl_3 , nebo na významnější agregaci, kterou je možno předpokládat na základě pozorovaného růstu viskozity roztoku polypeptidu v C_6D_6 ve srovnání s roztokem v CDCl_3 .

Pozorovaná změna poměru intenzit obou složek coupletu odráží mírnou deformaci skeletu α -helixu, která pravděpodobně probíhá při agregaci doprovázené tvorbou intermolekulárních vodíkových můstků mezi jednotlivými řetězci PBLG. V C_6D_6 a $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$ je tato interakce ještě zesílena přítomností benzenových kruhů v rozpouštědle. Solvatační efekt C_6D_6 a $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$ je tak jiný než u CDCl_3 a pravděpodobně podporuje vznik π - π interakcí. Důsledkem těchto interakcí je pak pozorovaný pozitivní VCD signál při 1736 cm^{-1} v obou spektrech a zvýšení intenzity tohoto signálu v absorpčním spektru. Signál VCD u 1736 cm^{-1} byl pozorován dříve pro roztoky PBLG v C_6D_6 a interpretován jako důsledek chirálního uspořádání



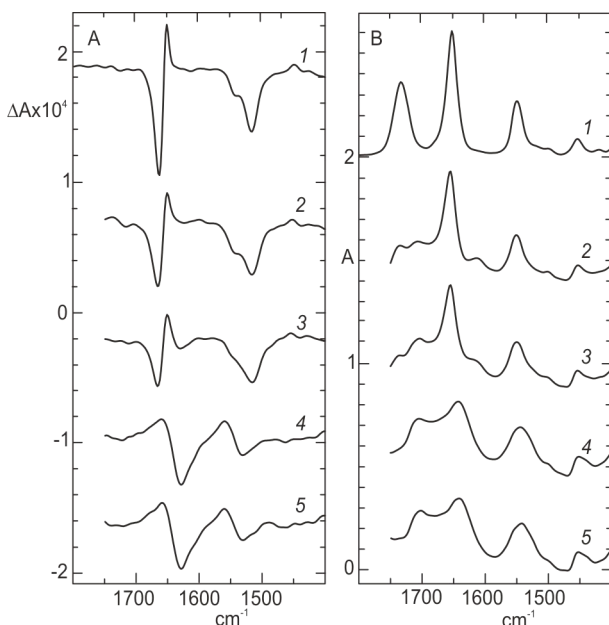
Obr. 2. VCD (A) a absorpční (B) IČ spektra asociovaných forem PBLG v CDCl_3 (1), v C_6D_6 (2) a v $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$ (3). Spektra jsou normalizována na jednotkovou hodnotu absorbance pásu amidu I

ní polypeptidové matrice a C=O skupiny esteru v postranních řetězcích polypeptidu^{12,13}. Ve spektru PBLG v CDCl₃ tento signál není patrný. V C₆D₆ a C₆D₅NO₂ jsou totiž benzylové kruhy v postranních řetězcích PBLG výše uvedenými interakcemi více stabilizovány než v CDCl₃. Nemohou se již tedy volně otáčet kolem esterové vazby (CO-O), změni se chiralita molekuly, a to se projeví na zesílení signálu charakteristického pro C=O v esterové skupině^{12,13}. Důsledkem větší agregace PBLG v C₆D₆ než v CDCl₃ je i vznik kapalných krystalů PBLG v C₆D₆ při nižších koncentracích PBLG než v roztoku CDCl₃.

Závislost struktury PBLG na složení směšného rozpouštědla CDCl₃/TFA

Na obr. 3 jsou uvedena spektra PBLG v CHCl₃ a ve směšném rozpouštědle CHCl₃/TFA o různém obsahu TFA. Pro tato měření byla použita nedeuterovaná rozpouštědla, protože v deuterovaných rozpouštědlech za přítomnosti TFA probíhala v molekule PBLG výměna H-D.

S postupným zvyšováním obsahu této kyseliny v rozpouštědlech se mění absorpční i VCD spektra. Intenzita absorpčního pásu u 1733 cm⁻¹ se s přidávkou kyseliny snižuje. Naopak přibližně současně narůstá intenzita pásu při 1702 cm⁻¹. S prvním přidávkou kyseliny se také objevuje nový pás při 1612 cm⁻¹ a mírně se snižuje hodnota absorbance pásu amidu I. Ve spektrech VCD lze ovšem pozorovat výraznější změny. Zvyšováním obsahu TFA v rozpouštědle do 10 obj.% se intenzity pásů coupletu v oblasti amidu I vyrovnávají a intenzity pásu amidu II při



Obr. 3. VCD (A) a absorpční (B) spektra PBLG v CHCl₃ (1) a ve směšném rozpouštědle CHCl₃/TFA – 5 obj.% TFA (2), 10 obj.% TFA (3), 15 obj.% TFA (4) a 20 obj.% TFA (5)

1516 cm⁻¹ se mírně snižují. Při obsahu TFA 15 obj.% se změni znaménka pásů coupletu amidu I a pás se posune k nižším vlnočtům – střed coupletu z 1654 na 1646 cm⁻¹. Současně se posouvá i poloha absorpčního pásu z 1652 na 1641 cm⁻¹. Mezi obsahy 10 a 15 obj.% TFA se také měni tvar VCD pásu amidu II a jeho absorpční pás se posouvá z 1548 na 1541 cm⁻¹.

Změny intenzit absorpčních pásů 1733 a 1702 cm⁻¹ lze vysvětlit následovně. V obou případech jde o vibraci vazby C=O skupiny esteru v postranním řetězci polypeptidu. Tato skupina interaguje s TFA vodíkovými můstky¹⁴, čímž se posune poloha příslušného charakteristického pásu ze 1733 cm⁻¹ na 1702 cm⁻¹. S rostoucím obsahem kyseliny roste intenzita pásu u nižších vlnočtů, zatímco intenzita pásu u vyšších vlnočtů klesá.

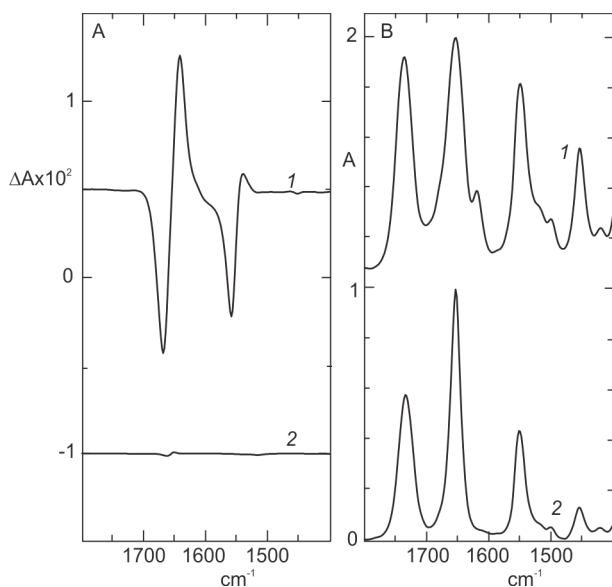
Nový pás při 1612 cm⁻¹ a malé snížení intenzity pásu amidu I je důsledkem vzniku vodíkových můstků mezi TFA a skupinou C=O v hlavním řetězci. TFA však neinteraguje se všemi skupinami C=O, ale pouze s dostupnými. To je důvodem malé intenzity tohoto pásu¹⁴.

Vyrovnání intenzity coupletu amidu I a snížení intenzity amidu II ve spektru VCD je pravděpodobně spojeno s klesající agregací jednotlivých šroubovic. Mnohem více polární a kyselá rozpouštědla TFA zabraňují asociaci tím, že konkurují tvorbě intermolekulárních vodíkových můstků mezi molekulami PBLG. Tato interpretace je v souladu s pozorovanou změnou konzistence vzorku. Při obsahu 10 obj.% TFA v rozpouštědle je viskozita vzorku nízká, molekuly PBLG tedy pravděpodobně výrazně neasociují, PBLG šroubovice je neporušená agregací a pozorovaná intenzita negativního a pozitivního pásu coupletu amidu I je stejná.

Při obsahu 15 obj.% TFA v rozpouštědle se měni znaménka pásů coupletu amidu I a pás se posouvá. Pozorované změny lze vysvětlit změnou konformace pravotočivého α -helixu na strukturu PPII charakterizovanou jako lokální levotočivou šroubovici⁸. Protože se lokálně měni smysl šroubovice z pravotočivé na levotočivou, měni se i znaménka VCD pásů. Posun středu coupletu souvisí jak se změnou konformace, tak s vodíkovými můstky mezi TFA a C=O skupinami hlavního řetězce. Při určitém obsahu kyseliny, která původně interaguje především s C=O v postranních řetězcích, se totiž vlivem těchto interakcí rozruší struktura šroubovice a TFA může interagovat i s většinou skupin C=O v hlavním řetězci polypeptidu. Zároveň se měni i jeho konformace na PPII. To je doprovázeno i posunem absorpčního pásu spektra, který se díky vodíkovým můstkům objevuje při 1641 cm⁻¹, tedy při nižším vlnočtu než je typické pro konformaci PPII.

Spektra VCD se měni i v oblasti amidu II při 1516 cm⁻¹. Pro vzorky s obsahem TFA mezi 10 a 15 obj.% se změni celý tvar pásu. Zároveň se posouvá i pás v absorpčním spektru. Tyto změny jsou opět způsobeny vznikem vodíkových můstků mezi TFA a skupinou C=O v hlavním řetězci polypeptidu¹⁴. Změna průběhu spektra VCD souvisí i se změnou sekundární konformace.

Získané výsledky tedy interpretujeme tak, že postupným zvyšováním obsahu TFA v roztoku PBLG v CHCl₃



Obr. 4. VCD (A) a absorpční (B) spektrum kapalných krystalů PBLG v C_6D_6 nad kritickou koncentrací, při níž se tvoří kapalně krystal (1), pro srovnání je ve stejném měřítku uvedeno spektrum PBLG v $CDCl_3$ (2). Spektra jsou normována na jednotkovou hodnotu absorbance pásu amidu I

na 10 obj.% se nejprve omezí agregace jednotlivých šroubovic a výrazně se sníží viskozita roztoku. Při obsahu TFA 10–15 obj.% nastávají výrazné konformační změny – pravotočivá šroubovice se změní na strukturu PPII. Dalším přidávkem TFA až do 20 obj.% již žádné konformační ani agregační změny neprobíhají.

Kapalně krystalové PBLG v C_6D_6

Na obr. 4 je uvedeno VCD a absorpční spektrum kapalných krystalů PBLG v C_6D_6 a pro srovnání i spektrum PBLG v $CDCl_3$, které bylo již uvedeno na obr. 2. Pro srovnání intenzit signálů obou forem PBLG je ve spektru VCD zachováno měřítko, které odpovídá intenzitě VCD pásů kapalných krystalů. Spektra kapalných krystalů jsou zde uvedena bez odečtu rozpouštědla, neboť prakticky nelze určit míru jeho absorbance v tomto systému.

Intenzita VCD signálu kapalných krystalů při srovnatelných hodnotách absorbance je asi stonásobně větší než u všech ostatních naměřených spekter. Opět je však pozorován pozitivní VCD couplet v oblasti amidu I, který je charakteristický pro konformaci α -helixu.

Závěr

Výsledky získané v předkládané práci jsou shrnuty do následujících bodů:

(i) Jasně se prokázalo, že metoda VCD je velmi citlivá při rozpoznávání jak změn v sekundární struktuře

PBLG, tak i jemnějších rozdílů v agregačních stavech. Ve spektru VCD byly prokázány různé agregační stavy PBLG – od specificky organizovaného v C_6D_6 , který vede až ke vzniku kapalných krystalů, přes nižší agregaci v $CDCl_3$, až po šroubovice polypeptidu, rozptýlené ve smíšeném rozpouštědle $CHCl_3/TFA$ při obsahu TFA 10 obj.%. Těto interpretaci odpovídá i konzistence měřených roztoků.

- (ii) Poprvé byla metodou VCD ukázána závislost sekundární struktury PBLG na složení smíšeného rozpouštědla $CHCl_3/TFA$. Ve spektrech VCD byly pozorovány charakteristické pásy v oblasti amidu I pro formy α -helix a PPII. Zcela jednoznačný přechod mezi oběma formami, jejichž spektra VCD se v oblasti amidu I a II výrazně liší, probíhá v rozmezí 10–15 obj.% TFA v rozpouštědle.
- (iii) Spektrum VCD kapalných krystalů PBLG v C_6D_6 je charakteristické vysokou intenzitou jednotlivých VCD pásů. Tato tematika však bude kvůli své složitosti předmětem dalšího studia.

Tato práce byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (MSM 6046137307) a Grantovou agenturou České republiky (GA ČR 203/07/1335).

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

LITERATURA

- Urbanová M., Maloň P., v knize: *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry* (Schalley C., ed.) Wiley-VCH, Weinheim 2007.
- Berova N., Nakanishi K., Woody R.W. (ed.): *Circular Dichroism. Principles and Applications*. Wiley, New York 2000.
- Pauling L., Corey R. B.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 37, 241 (1951).
- Chakrabarti S., Miller W. G.: *Biopolymers* 23, 719 (1984).
- Torii T., Yamashita T., Horie K.: *Eur. Polym. J.* 29, 1265 (1993).
- Patel D. L., Dupre D. B.: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 53, 323 (1979).
- Elias H. G.: *Int. J. Polym. Mater.* 4, 209 (1976).
- Dukor R. K., Keiderling T. A.: *Biopolymers* 31, 1747 (1991).
- Urbanová M., Setnická V., Volka K.: *Chirality* 12, 199 (2000).
- Julínek O.: *Diplomová práce*. VŠCHT Praha, Praha 2006.
- Yasui S. C., Keiderling T. A.: *Biopolymers* 25, 5 (1986).
- Palivec L.: *Disertační práce*. VŠCHT Praha, Praha 2006.
- Palivec L., Urbanová M.: *Proc. Third Int. and 28th Eur. Peptide Symp.* (Flegel M., Fridkin M., Gilon C.,

Slaninova J., ed.), str. 1057. Kenes International, Geneva 2005.

14. Combélas P., Garrigou C., Lascombe J.: *Biopolymers* 13, 577 (1974).

P. Novotná^a and M. Urbanová^b (^a*Department of Analytical Chemistry and* ^b*Department of Physics and Measurement, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic*): **Conformational Study of Poly(γ -benzyl-L-glutamate) by Vibrational Circular Dichroism**

Poly(γ -benzyl-L-glutamate) (PBLG), a synthetic polypeptide, is soluble in organic solvents. Conformations and

aggregation of PBLG were studied by vibrational circular dichroism spectroscopy (VCD) at various concentrations or acidities. In some solvents PBLG exhibits an α -helical conformation. The aggregation of PBLG was followed in CDCl₃, CHCl₃, C₆D₆ and C₆D₅NO₂. A decrease in aggregation was observed in 5 or 10 vol.% solutions of trifluoroacetic acid (TFA) in CHCl₃. The polyproline II conformation of PBLG was observed in 15 or 20 vol.% TFA solution in CHCl₃. In other solvents such as benzene, PBLG strongly aggregates; the formation of cholesteric liquid crystals was observed at concentrations higher than 50 g l⁻¹. These highly ordered structures were characterized by VCD signals that are about 100 times stronger than for PBLG in CDCl₃.