WIADOMOŚCI *chemiczne* 2012, **66**, 9-10
PL ISSN 0043-5104

BADANIE STRUKTURY I DYNAMIKI *N*-TERMINALNYCH SEKWENCJI DERMORFINY I ICH ANALOGÓW Z WYKORZYSTANIEM SPEKTROSKOPII NMR W CIELE STAŁYM I RENTGENOGRAFII

STUDIES ON THE STRUCTURE AND DYNAMICS OF *N*-TERMINAL SEQUENCES OF DERMORPHIN AND THEIR ANALOGS BY MEANS OF SOLID STATE NMR SPECTROSCOPY AND XRD

Katarzyna Trzeciak-Karlikowska

Samodzielna Pracownia Badań Strukturalnych,
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
e-mail: ktrzecik@cbmm.lodz.pl

Abstract
Wprowadzenie
1. Badania strukturalne
   1.1. Analiza rentgenograficzna tripeptydu Tyr-Ala-Phe, tetrapeptydu Tyr-D-Ala-Phe-Gly i jego analogu z L-alaniną
   1.2. Badania tripeptydu Tyr-Ala-Phe oraz tetrapeptydów Tyr-Ala-Phe-Gly i Tyr-D-Ala-Phe-Gly za pomocą spektroskopii NMR w ciele stałym
2. Badania dynamiki molekularnej z wykorzystaniem spektroskopii NMR w ciele stałym
   2.1. Zastosowanie eksperymentów PILGRIM I PISEMA MAS w badaniach dynamiki *N*-terminalnych sekwencji dermorfiny z L- i D-alaniną
   2.2. Badanie dynamiki pierścieni aromatycznych selektywnie znakowanych tripeptydów Tyr-D-Ala-Phe i Tyr-Ala-Phe za pomocą rezonansu deuterowego
3. Badanie oddziaływania znakowanego izotopowo tetrapeptydu Tyr-D-Ala-Phe-Gly z błoną fosfolipidową
Podsumowanie
Piśmiennictwo cytowane

Dr Katarzyna Trzeciak-Karlikowska jest absolwentką Wydziału Fizyki i Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Stopień doktora nauk chemicznych nadany przez Radę Naukową Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi otrzymała w 2012 roku po obronie rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „Badanie struktury i dynamiki peptydów opioidowych i ich analogów z wykorzystaniem spektroskopii NMR w ciele stałym i rentgenografii" wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marka J. Potrzebowskiego. Obecnie pracuje w Samodzielnej Pracowni Badań Strukturalnych CBMiM PAN, a Jej zainteresowania związane są z syntezą i badaniami strukturalnymi wybranych peptydów opioidowych, a także analizą ich oddziaływań z układami fosfolipidowymi z wykorzystaniem spektroskopii NMR.

ABSTRACT

Deltorphin I (Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH_2) and dermorphin (Tyr-D-Ala-Phe--Gly-Tyr-Pro-Ser-NH_2) are natural opioid peptides that have been isolated from the skin of South American frogs [1]. The presence of D-amino acid is crucial for their biological activity. The synthetic analogs of given heptapeptides containing L-alanine are not analgesics [2]. Analysis of the influence of stereochemistry on molecular packing, dynamics and biological functions of neuropeptides is still important for receptor studies and practical applications (e.g. design of new selective pain killers).

Presented research is focused on the structure and dynamics of two *N*-terminal sequences of dermorphin: tripeptide Tyr-D-Ala-Phe **1**, tetrapeptide Tyr-D-Ala-Phe-Gly **2**, and their analogs with L-alanine: Tyr-Ala-Phe **3** and Tyr-Ala-Phe-Gly **4**, using solid state NMR and X-ray diffraction. This study clearly demonstrates that **1** and **2** crystallized under different conditions to form exclusively one structure [3, 4]. In contrast, tripeptide and tetrapeptide with L-Ala in the sequence very easily form different crystal modifications. Tyr-Ala-Phe **3** crystallizes into two forms: **3a** and **3b** [5], while Tyr-Ala-Phe-Gly **4** gives three modifications: **4a**, **4b** and **4c** [4]. It seems that one of the factors, which can be important in the preorganization mechanism anticipating the formation of crystals, is the intramolecular CH-π interaction between aromatic rings of tyrosine and/or phenylalanine and the methyl group of alanine. Such interaction is possible only for D-Ala residue. For L-Ala in the peptide sequence, the methyl group is aligned on the opposite side with respect at least to one of the aromatic groups. It can be further speculated that such internal CH-π contacts can also occur during the interaction of ligand–receptor, making the message sequence of opioid peptides more rigid and finally selective. By employing different NMR experiments (e.g. PISEMA MAS and PILGRIM) it was proven that the main skeleton of analyzed peptides is rigid, whereas significant differences in the molecular motion of the aromatic residues were observed [4, 6]. Solid state ^{2}H NMR spectroscopy of samples with deuterium labeled aromatic rings: Tyr^{d4}-D-Ala-Phe **5**, Tyr-D-Ala-Phe^{d5} **6**, Tyr^{d4}-Ala-Phe **7**, Tyr-Ala-Phe^{d5} **8** was used to analyze the geometry and time scale of the molecular motion. At ambient temperature, the tyrosine ring of sample **5** is rigid and in the sample **6** the phenylalanine ring undergoes a „π-flip". The tyrosine rings of form I of **7** and **8** are static, while the phenylalanine rings of form II of **7** and **8** undergo a fast regime exchange [6]. Variable temperature ^{2}H measurements proved that the tyrosine and phenylalanine rings of two forms of compounds **7** and **8** became more mobile with increasing temperature. In contrast, the aromatic rings of samples **5** and **6** preserve their dynamics regime (static tyrosine and „π-flip" phenylalanine) in a large range of temperatures [6].

The analysis of ^{13}C, ^{15}N labeled tetrapeptide Tyr-D-Ala-Phe-Gly **2'**-phospholipid membrane interactions suggests that peptide **2'** is aligned on the surface of the membrane (RFDR MAS) and the sandwich-like π-CH_3-π arrangement of the pharmacophore is preserved (DARR) [7].

Keywords: opioid peptides, CH-π interactions, molecular dynamics, peptide–phospholipid interaction, NMR spectroscopy, ^{1}H Ultra Fast MAS NMR, PISEMA MAS, PILGRIM, XRD
Słowa kluczowe: peptydy opioidowe, oddziaływania CH-π, dynamika molekularna, oddziaływanie peptyd–fosfolipid, spektroskopia NMR, ^{1}H Ultra Fast MAS NMR, PISEMA MAS, PILGRIM, XRD

WPROWADZENIE

W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się badaniom aktywności biologicznej i aspektów strukturalnych peptydów opioidowych. Ogromne zainteresowanie tą grupą związków wynika głównie z ich właściwości analgetycznych i możliwości wykorzystania jako potencjalnych leków przeciwbólowych nowej generacji. „Typowe" peptydy opioidowe, podobnie jak klasyczne opiaty na czele z morfiną, nie wykazują wyraźnej specyficzności w stosunku do receptorów μ, δ, κ, co może być przyczyną występowania efektów ubocznych podczas ich stosowania. Bardziej wybiórcze okazały się dermorfina (Tyr--D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH_2) oraz deltorfina I (Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val--Gly-NH_2) i II (Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH_2), peptydy wyizolowane ze skóry południowoamerykańskich żab z rodzaju *Phyllomedusa* [1]. Obecność D-alaniny w strukturze jest elementem decydującym o ich aktywności biologicznej. Z badań wynika, że syntetyczne analogi zawierające L-alaninę są nieaktywne i bezużyteczne z punktu widzenia zastosowań farmakologicznych [2]. Pełne zrozumienie roli D-alaniny i jej wpływu na bioaktywną konformację neuropeptydów jest kluczowym zagadnieniem pozwalającym zrozumieć mechanizm oddziaływań ligand--receptor, a także „projektować" nowe leki o większej aktywności i selektywności.

Mając na uwadze fakt, że struktura krystaliczna powyższych peptydów nie została dotąd poznana, prace badawcze zmierzające do określenia współzależności struktury i aktywności biologicznej tych związków prowadzone były na ich krótszych fragmentach odpowiedzialnych za rozpoznanie oraz połączenie się z miejscem wiążącym receptora. W przedstawionym artykule omówione zostały badania struktury i dynamiki dwóch *N*-terminalnych fragmentów dermorfiny: tripeptydu Tyr-D-Ala-Phe i tetrapeptydu Tyr-D-Ala-Phe-Gly oraz ich analogów z L-alaniną. Porównanie peptydów posiadających w sekwencji alaninę o przeciwnych konfiguracjach miało na celu wyjaśnienie wpływu stereochemii tego aminokwasu na konformację łańcucha, upakowanie molekularne w sieci krystalicznej, a w konsekwencji na dynamikę analizowanych układów. Do badań wykorzystano zaawansowane techniki spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego w ciele stałym SS NMR (ang. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*) i rentgenografię XRD (ang. *X-Ray Diffraction*). Pomimo, że techniką SS NMR analizuje się układy sproszkowane, a w przypadku X-Ray są to badania monokryształu, komplementarność obu tych technik jest oczywista. NMR jest dobrą metodą śledzenia polimorfizmu, kontrolowania procesu krystalizacji, lokalnych zaburzeń uporządkowania materii, a także dynamiki cząsteczki. X-ray pozwala wyznaczyć wzajemne położenia atomów, a dodatkowo umożliwia lepszą interpretację wyników uzyskanych z pomiarów NMR.

Uzupełnieniem prezentowanych badań była analiza oddziaływań tetrapeptydu Tyr-D-Ala-Phe-Gly zbudowanego ze znakowanych ^{13}C i ^{15}N aminokwasów z błoną fosfolipidową oraz próba wyznaczenia jego bioaktywnej konformacji w warunkach biomimetycznych i jej porównanie z konformacją zdefiniowaną metodami dyfrakto-

metrycznymi. Problem ten jest niezwykle ważny, ponieważ określenie w przypadku peptydów opioidowych ich bioaktywnej konformacji jest jednym z trudniejszych zadań współczesnej chemii strukturalnej. Wynika to przede wszystkim z braku dokładnych informacji strukturalnych o receptorach, z którymi oddziałują te peptydy, a w szczególności o ich stanach aktywnych.

1. BADANIA STRUKTURALNE

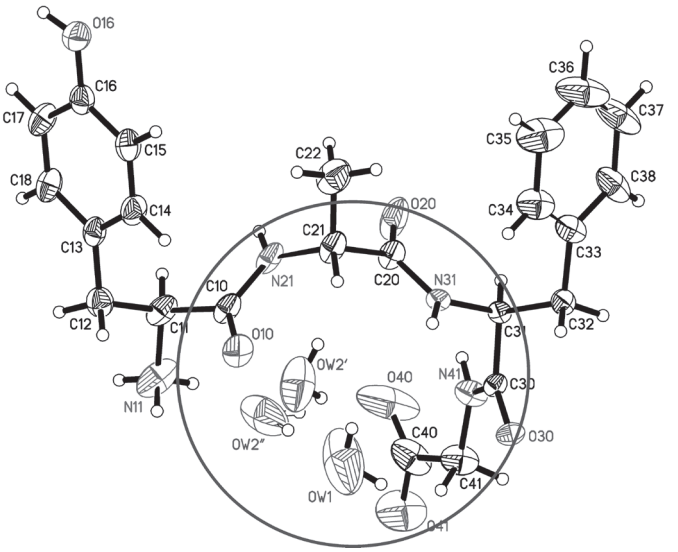
Otrzymano krystaliczną postać peptydów: Tyr-D-Ala-Phe **1**, Tyr-D-Ala-Phe-Gly **2** oraz ich analogów z L-alaniną: Tyr-Ala-Phe **3**, Tyr-Ala-Phe-Gly **4**, dla których wykonane zostały badania z użyciem techniki SS NMR. Do analizy rentgenograficznej wykorzystano monokryształy peptydów **2**, **3** i **4**. Badania te dostarczyły informacji o geometrii molekularnej, a także o wewnątrz- i międzycząsteczkowych oddziaływaniach występujących w tych układach.

1.1. ANALIZA RENTGENOGRAFICZNA TRIPEPTYDU Tyr-Ala-Phe, TETRAPEPTYDU Tyr-D-Ala-Phe-Gly I JEGO ANALOGU Z L-ALANINĄ [4, 5]

Omawiając wyniki badań XRD warto zwrócić uwagę na dwa aspekty. W przypadku układów modelowych z D-alaniną otrzymywano zawsze jedną strukturę, bez względu na zastosowane warunki krystalizacji, podczas gdy tri- i tetrapeptydy posiadające w sekwencji enancjomer L mają tendencję do tworzenia różnych form krystalicznych. Wykrystalizowano dwie formy tripeptydu Tyr-Ala-Phe **3** (**3a** i **3b**) oraz trzy formy peptydu Tyr-Ala-Phe-Gly **4** (**4a, 4b** i **4c**).

Wartym podkreślenia jest również fakt, że istotnym elementem strukturalnym w peptydzie Tyr-D-Ala-Phe-Gly są słabe wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania CH-π, utworzone pomiędzy grupą metylową D-alaniny a pierścieniami aromatycznymi tyrozyny i fenyloalaniny, pomimo „pseudocyklicznej" konformacji tego peptydu wymuszonej obecnością wiązań wodorowych między końcem aminowym i karboksylowym z zaangażowaniem cząsteczki wody (Rys. 1). Specyficzny układ typu „sandwich" (π-CH_3-π) występuje również w tripeptydzie Tyr-D-Ala-Phe, z tą tylko różnicą, że grupa metylowa alaniny znajduje się bliżej pierścienia aromatycznego tyrozyny, z którym tworzy jedno wewnątrzcząsteczkowe oddziaływanie CH-π [3]. Tego typu interakcje bardzo często występują w połączeniach peptydowych i pomimo ich niewielkiej energii mają wpływ na upakowanie przestrzenne atomów, jak również na dynamikę grup bocznych i konformacje tych związków, co zostanie zaprezentowane w dalszej części tego artykułu.

W peptydach Tyr-Ala-Phe i Tyr-Ala-Phe-Gly grupa metylowa znajduje się po przeciwnej stronie w stosunku do pierścieni aromatycznych tyrozyny i fenyloalaniny, w związku z czym nie tworzy z nimi wewnątrzcząsteczkowych, a jedynie międzycząsteczkowe kontakty CH-π.



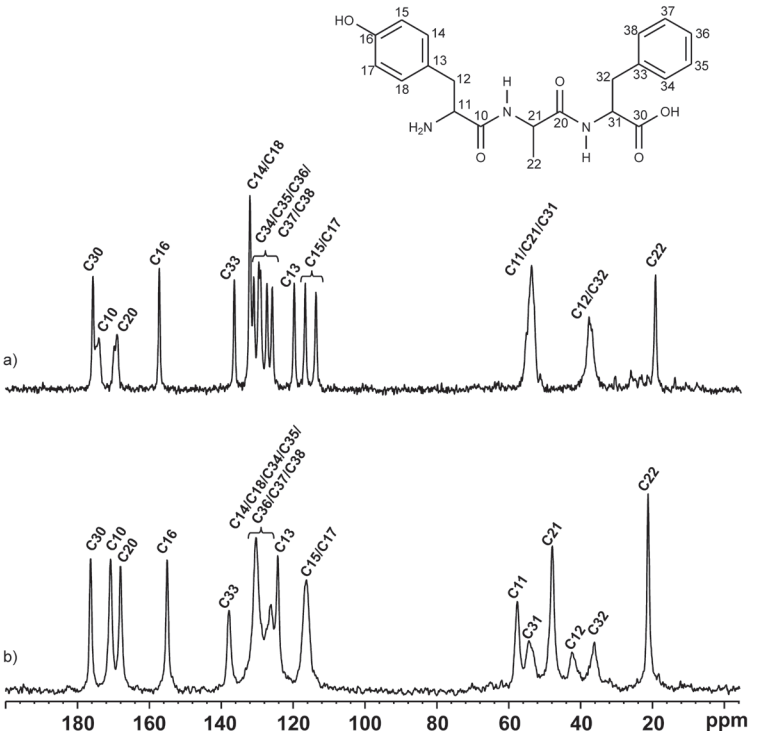
Rysunek 1. Struktura krystaliczna tetrapeptydu Tyr-D-Ala-Phe-Gly **2** z widocznym układem typu „sandwich" (π-CH_3-π) oraz z zaznaczonym fragmentem „pseudocyklicznym" tworzącym się między końcem aminowym i karboksylowym z udziałem cząsteczki wody.

Figure 1. The crystal structure of Tyr-D-Ala-Phe-Gly **2** with shown „sandwich" system of (π-CH_3-π) type and the „pseudocyclic" fragment created between the *N*- and *C*-terminus groups involving water molecule

1.2. BADANIA TRIPEPTYDU Tyr-Ala-Phe ORAZ TETRAPEPTYDÓW Tyr-Ala-Phe-Gly I Tyr-D-Ala-Phe-Gly ZA POMOCĄ SPEKTROSKOPII NMR W CIELE STAŁYM [4, 5]

Rejestrując jednowymiarowe widma ^{13}C CP-MAS (ang. *Cross-Polarization Magic Angle Spinning*) potwierdzono obecność dwóch form krystalicznych tripeptydu Tyr-Ala-Phe **3** (Rys. 2). Widać znaczące różnice pomiędzy formą **3a** i **3b** w obszarze alifatycznym, aromatycznym i karbonylowo/karboksylowym. Linie rezonansowe odpowiadające karbonylowym atomom węgla: tyrozyny – C10 i alaniny – C20 bezpośrednio związanych z atomami azotu ^{14}N są rozszczepione w przypadku formy I. Wynika to z obecności resztkowego sprzężenia dipolowego ^{13}C-^{14}N, które nie jest uśredniane do zera w wyniku zastosowanej techniki MAS. W widmie formy **3a** widoczne są trzy linie rezonansowe w zakresie 113–120 ppm, podczas gdy dla formy **3b** występuje tylko jeden sygnał w tym zakresie przy 116,7 ppm. Poszerzenie sygnałów formy II wynika z obecności dwóch cząsteczek tego peptydu w asymetrycznej części komórki elementarnej. Potwierdza to wyniki badań rentgenograficznych i świadczy o komplementarności tych dwóch metod badawczych. Przypisania sygnałów rezonansowych na widmach ^{13}C CP-MAS do struktury molekularnej peptydów **3a** i **3b** dokonano na podstawie eksperymentu Dipolar Dephasing i analizy wartości głównych elementów tensora przesunięcia chemicznego,

wyznaczonych z eksperymentu 2D PASS (ang. *Phase-Adjusted Spinning Sidebands*). W oparciu o analizę mocy wiązań wodorowych, uzyskanych z pomiarów XRD, rozróżniono sygnały rezonansowe karbonylowych i karboksylowych atomów węgla.



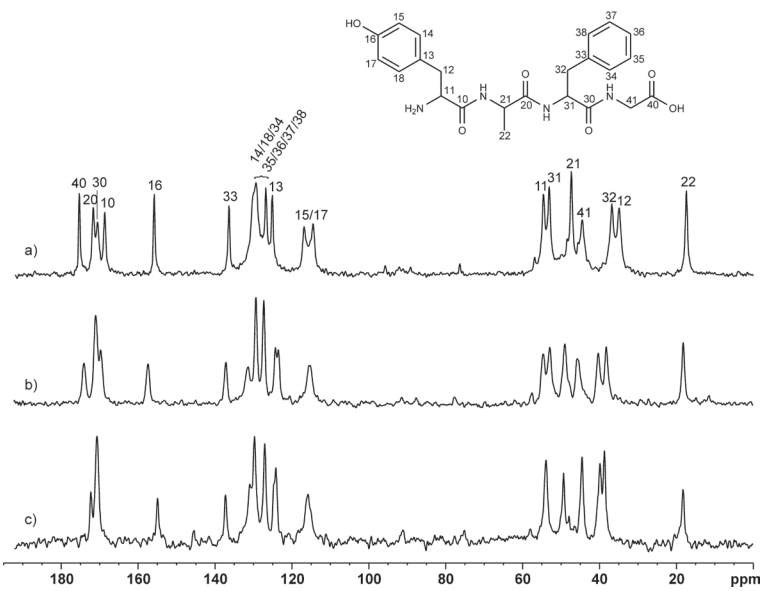
Rysunek 2. Widma ^{13}C CP-MAS dwóch form tripeptydu Tyr-Ala-Phe **3** zarejestrowane w temperaturze pokojowej, przy prędkości rotacji 8 kHz wraz z przypisaniami sygnałów rezonansowych: a) forma **3a**, b) forma **3b**

Figure 2. ^{13}C CP-MAS spectra of two forms of tripeptide Tyr-Ala-Phe **3** recorded at room temperature with a spinning rate of 8 kHz and the assignment of ^{13}C resonance signals: a) form **3a**, b) form **3b**

Podobne podejście metodologiczne, jak w przypadku struktur **3a** i **3b**, zastosowano dla tetrapeptydu Tyr-D-Ala-Phe-Gly **2** i dwóch form Tyr-Ala-Phe-Gly – **4a** i **4b**, dla których wykonano widma ^{1}H Ultra Fast (UF) MAS, jak również ^{13}C CP-MAS. Do badań wykorzystano tylko układy **4a** i **4b**, ponieważ nie udało się wykrystalizować formy **4c** w ilości wystarczającej do pomiarów NMR.

Porównując widma ^{13}C CP-MAS tetrapeptydów **2** i **4** (Rys. 3) można wnioskować, że pomimo takiej samej sekwencji aminokwasowej tych związków, obecność alaniny o konfiguracji D w łańcuchu peptydowym ma istotny wpływ na strukturę krystaliczną, upakowanie molekularne i dynamikę grup bocznych. Linie rezonansowe znajdujące się w obszarze karboksylowo/karbonylowym są lepiej rozdzielone na widmie peptydu **2** w porównaniu z peptydem **4**, w przypadku którego widoczne jest ich nałożenie i poszerzenie. Z kolei sygnały rezonansowe pocho-

dzące od atomów C15 i C17 pierścienia aromatycznego tyrozyny zarówno dla formy **4a**, jak i **4b** są uśrednione. Koalescencja ta nie występuje w przypadku peptydu **2**, w widmie którego obecne są dwa sygnały znajdujące się w zakresie 110–120 ppm. Sugeruje to, że aromatyczne pierścienie tych związków podlegają odmiennym procesom dynamicznym, wynikającym najprawdopodobniej z obecności wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań CH-π w peptydzie Tyr-D-Ala-Phe--Gly **2**, których istnienie wykazała analiza XRD. Niewielkie różnice w kształcie linii rezonansowych i ich przesunięciach chemicznych analizowanych peptydów widać również w rejonie alifatycznym (15–60 ppm).

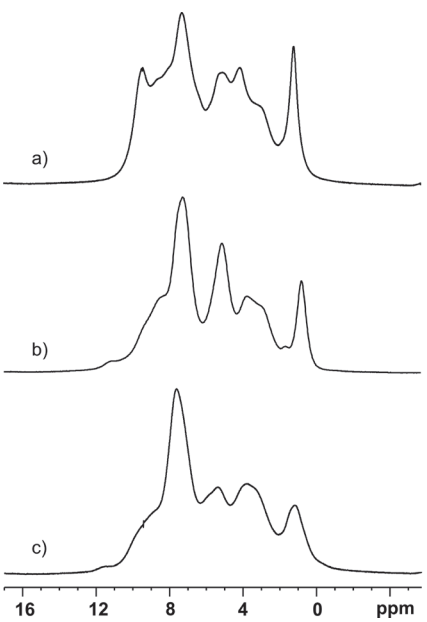


Rysunek 3. Widma ^{13}C CP-MAS tetrapeptydów zarejestrowane w temperaturze pokojowej przy prędkości rotacji 8 kHz a) Tyr-D-Ala-Phe-Gly **2** wraz z przypisaniami sygnałów rezonansowych do struktury molekularnej zaprezentowanej powyżej widm, b) forma **4a**, c) forma **4b**

Figure 3. ^{13}C CP-MAS spectra of tetrapeptides recorded at room temperature with a spinning rate of 8 kHz: a) Tyr-D-Ala-Phe-Gly **2** with the assignment of ^{13}C resonance signals to molecular structure shown above spectra b) form **4a**, c) form **4b**

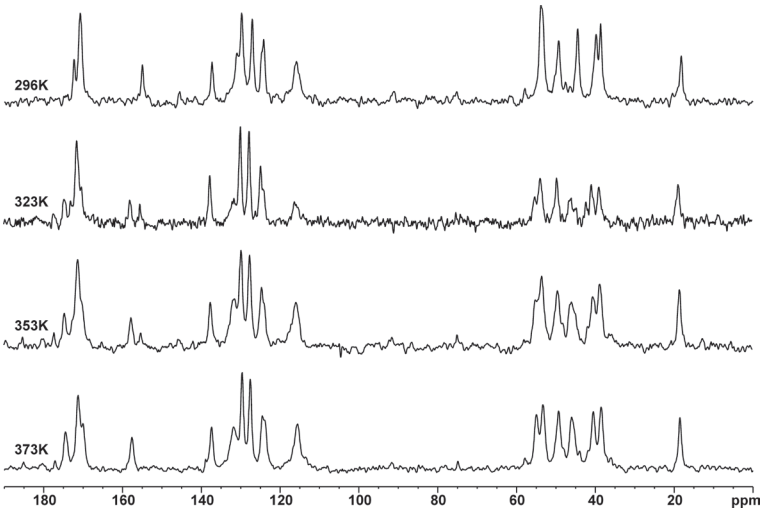
Różnice świadczące o odmiennych strukturach krystalicznych peptydów **2** i **4** można zauważyć także na widmach ^{1}H UF MAS wykonanych przy prędkości rotacji 60 kHz (Rys. 4). Linie rezonansowe tetrapeptydu **2** są relatywnie ostre i lepiej rozdzielone w porównaniu z sygnałami pochodzącymi od form **4a** i **4b**. Widoczną różnicą pomiędzy nimi jest obecność intensywnego sygnału na widmie przy δ_{izo} = 5,0 ppm dla formy **4b** w stosunku do formy **4a**, pochodzącego od cząsteczek wody obecnych w sieci krystalicznej (Rys. 4b i c). Interesującym jest fakt, że intensywność tego sygnału zmniejsza się stopniowo podczas przechowywania próbki w temperaturze pokojowej, w konsekwencji czego po pewnym czasie widmo formy **4b** jest takie samo w porównaniu z widmem formy **4a**. Tą transfor-

mację lepiej przedstawiają widma ^{13}C CP-MAS wykonane w zakresie temperatur 296–373 K (Rys. 5). Najbardziej diagnostyczny obszar, pokazujący etapy przejścia jednej formy w drugą, znajduje się w zakresie 150–160 ppm (atom węgla C16). W temperaturze 323 K w tym rejonie widoczne są już dwa sygnały rezonansowe o porównywalnej intensywności, co wskazuje na obecność zarówno formy **4b**, jak i **4a** tetrapeptydu **4**. Podnosząc temperaturę o 30 K stosunek wielkości sygnałów obu form w próbce zmienia się na korzyść formy **4a** (δ_{izo} = 157,7 ppm). Natomiast w 373 K jest już obecna tylko struktura **4a**. W podobny sposób wizualizują ten proces sygnały atomów karbonylowo/karboksylowych (165–180 ppm) i alifatycznych (42–60 ppm). Tego typu przemiana jest wynikiem powolnego uwalniania cząsteczek wody z sieci krystalicznej formy **4b**, co wskazywał wcześniejszy eksperyment ^{1}H UF MAS. Interesującym jest, że po ochłodzeniu wcześniej ogrzanej próbki nie obserwowano powrotu do wyjściowej formy **4a**. Ponadto próba ponownego dyfuzyjnego wprowadzenia wody do sieci krystalicznej nie powiodła się, co jest kolejnym dowodem na nieodwracalność tego procesu.



Rysunek 4. Widma ^{1}H UF MAS tetrapeptydów zarejestrowane w temperaturze pokojowej przy prędkości rotacji 60 kHz: a) Tyr-D-Ala-Phe-Gly **2**, b) forma **4a**, c) forma **4b**

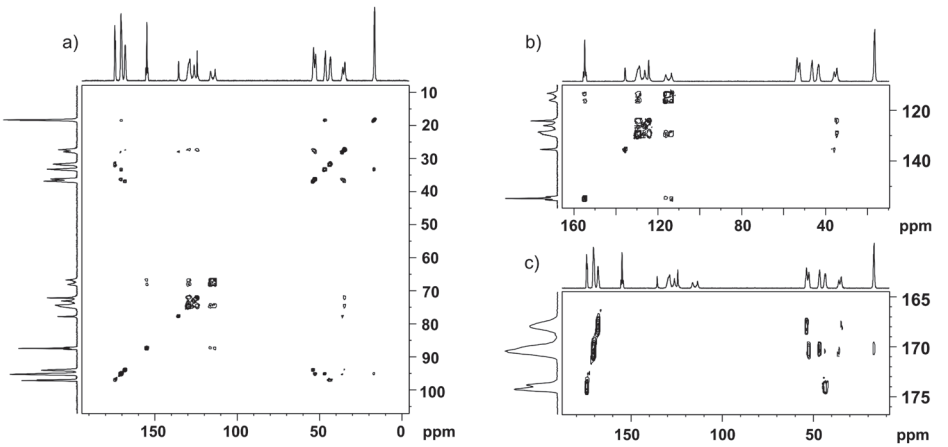
Figure 4. ^{1}H UF MAS NMR spectra of tetrapeptides recorded at room temperature with a spinning rate of 60 kHz: a) Tyr-D-Ala-Phe-Gly **2**, b) form **4a**, c) form **4b**



Rysunek 5. Widma ^{13}C CP-MAS formy **4b** zarejestrowane w zakresie temperatur 296–373 K przy prędkości rotacji 8 kHz

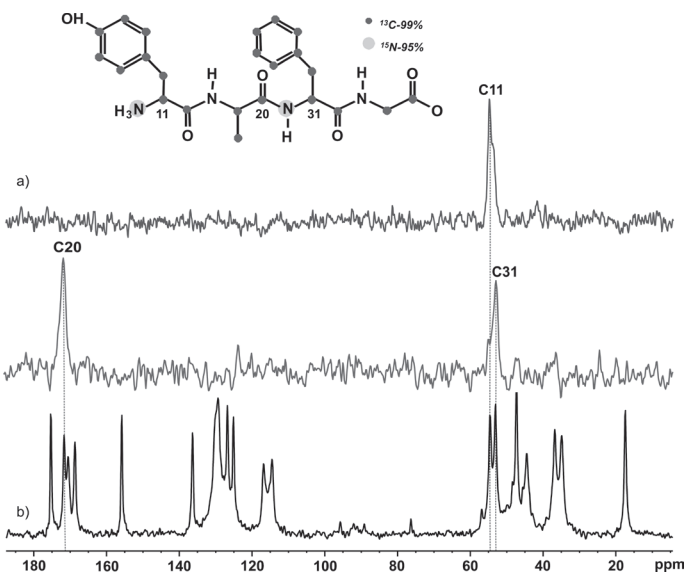
Figure 5. ^{13}C CP-MAS spectra of form **4b** recorded at temperature range 296–373 K with a spinning rate of 8 kHz

Przypisań strukturalnych tetrapeptydu **2** dokonano na podstawie homo- i heterojądrowych eksperymentów w ciele stałym. Najbardziej diagnostycznym z nich okazał się eksperyment ^{13}C-^{13}C DARR (ang. *Dipolar-Assisted Rotational Resonance*) [8], wykonany z użyciem mieszaniny (9:1, m/m) związku **2** i tetrapeptydu Tyr-D-Ala-Phe-Gly **2'** znakowanego izotopami ^{13}C i ^{15}N, którego syntezę zaplanowano w kontekście badań z układami fosfolipidowymi (Rys. 6). Niemniej jednak ze względu na nałożenie sygnałów rezonansowych karbonylowych atomów węgla alaniny – C20 i fenyloalaniny – C30, konieczne było zastosowanie innego podejścia eksperymentalnego pozwalającego na ich jednoznaczne rozróżnienie. Użyto tu eksperymentu wykorzystującego podwójną polaryzację skrośną ^{1}H-^{15}N-^{13}C DCP MAS (ang. *Double Cross-Polarization*) [9]. Polega on na przeniesieniu polaryzacji z jąder ^{1}H na ^{15}N podczas pierwszego transferu, a w drugim – z jąder ^{15}N na ^{13}C, w konsekwencji czego otrzymuje się widmo jednowymiarowe 1D ^{13}C lub 2D ^{13}C-^{15}N. Tego typu widma wykonane z użyciem mieszaniny peptydów **2** i **2'** przedstawione są na Rysunkach 7 i 8.



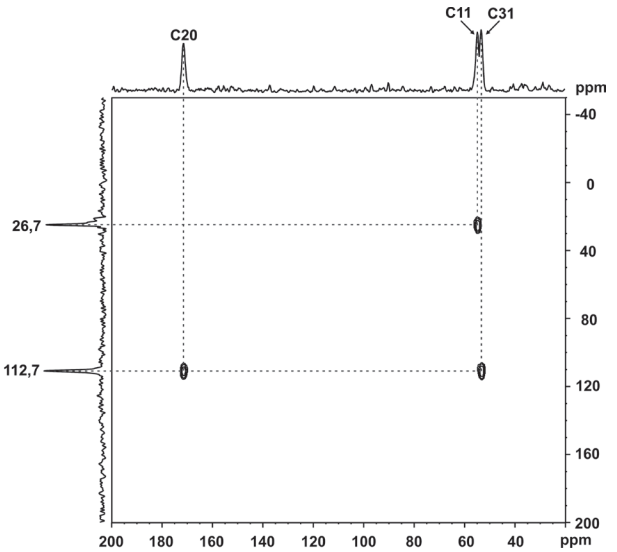
Rysunek 6. Widma 2D ^{13}C-^{13}C DARR mieszaniny peptydów **2** i **2'** zarejestrowane z prędkością rotacji 20 kHz i czasem mieszania równym 32 ms: a) widmo 2D DARR w pełnym zakresie, b) obszar aromatyczny w projekcji F1 widma, c) obszar karbonylowo/karboksylowy w projekcji F1 widma

Figure 6. 2D ^{13}C-^{13}C DARR spectra of peptides **2** and **2'** mixture recorded with a spinning rate of 20 kHz and mixing time equal to 32 ms: a) 2D DARR spectrum, b) the aromatic region of F1 projection, c) the carbonyl/carboxyl region of F1 projection



Rysunek 7. Widma ^{13}C: a) DCP-MAS mieszaniny peptydów **2** i **2'**; pierwsze widmo przedstawia sygnał atomu węgla C11 połączonego z amoniowym atomem azotu tyrozyny, a drugie – sygnały rezonansowe atomów węgla C20 i C31 związanych z amidowym atomem azotu fenyloalaniny, b) CP-MAS tetrapeptydu **2**

Figure 7. ^{13}C spectra: a) DCP-MAS of peptides **2** and **2'** mixture; the first spectrum show the signal of C11 carbon atom bonded to ammonium nitrogen atom of tyrozine, and the second spectrum – resonance signals of C20 and C31 carbon atoms bonded to amide nitrogen atom of phenylalanine, b) CP-MAS of tetrapeptide **2**



Rysunek 8. Widmo ^{13}C-^{15}N DCP-MAS mieszaniny peptydów **2** i **2'**; korelacja atomu azotu: ^{15}N grupy amoniowej – 26,7 ppm i ^{15}N grupy amidowej fenyloalaniny – 112,7 ppm

Figure 8. ^{13}C-^{15}N DCP-MAS spectrum of peptides **2** and **2'** mixture; the correlation of: ^{15}N nitrogen atom of ammonium group of phenylalanine – 26,7 ppm and ^{15}N nitrogen atom of amide group of phenylalanine – 112,7 ppm

2. BADANIA DYNAMIKI MOLEKULARNEJ Z WYKORZYSTANIEM SPEKTROSKOPII NMR W CIELE STAŁYM

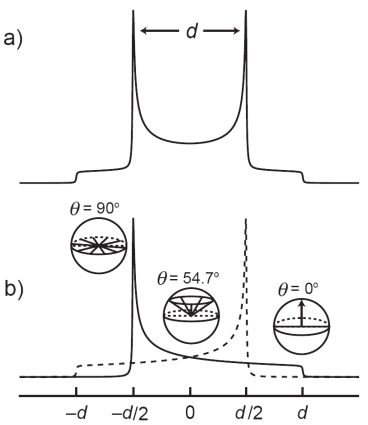
Problem dynamiki molekularnej jest szczególnie istotny podczas analizy układów w warunkach fizjologicznych, czyli w temperaturach ok. 37°C. Dzisiaj standardem w badaniach rentgenograficznych są badania niskotemperaturowe, tak też zostały wykonane pomiary X-Ray prezentowanych peptydów. Jednak w przypadku wykorzystywania struktur rentgenograficznych jako układy odniesienia do badań modelowych peptyd-receptor, procesy dynamiczne muszą być w jakimś stopniu rozpoznane.

Spektroskopia NMR oferuje kilka metod pozwalających badać dynamikę molekularną w ciele stałym: pomiary czasów relaksacji $^{13}C\ T_1$, $^{13}C\ T_{1\rho}$, analiza profili polaryzacji skrośnej, głównych elementów tensora i kształtu linii widma jądra deuteru. Wszystkie te podejścia, wykazujące zróżnicowanie procesów dynamicznych pierścieni aromatycznych tyrozyny i fenyloalaniny w badanych peptydach, zastosowano w ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej. Jednak w artykule przedstawione zostaną jedynie wyniki badań uzyskane za pomocą rezonansu deuterowego oraz technik „recouplingowych" PISEMA (ang. *Polarization Inversion Spin Exchange at the Magic Angle*) [10] i PILGRIM (ang. *Phase-Inverted LG RecouplIng under MAS*) [11], które nie były wcześniej wykonywane w Samodzielnej Pracowni Badań Struk-

turalnych, ani w żadnym laboratorium w Polsce. Czytelnik zainteresowany głębszą analizą prezentowanej tematyki bez trudu dotrze do prac oryginalnych cytowanych w tym artykule.

2.1. ZASTOSOWANIE EKSPERYMENTÓW PILGRIM I PISEMA MAS W BADANIACH DYNAMIKI *N*-TERMINALNYCH SEKWENCJI DERMORFINY Z L- I D-ALANINĄ [4, 6]

Wirowanie próbki pod kątem magicznym eliminuje lub redukuje sprzężenia dipolowe, co w konsekwencji prowadzi do utraty wielu cennych informacji na temat struktury i dynamiki cząsteczek. W celu odzyskania (ang. *recoupling*) tych informacji stosuje się odpowiednie sekwencje impulsowe, które są zaprojektowane w taki sposób, aby w czasie eksperymentu „przywrócić" sprzężenia pomiędzy oddziaływującymi spinami jądrowymi. Spośród wielu sekwencji „recouplingowych" na szczególną uwagę zasługują LG-CP, PISEMA czy PILGRIM, od pewnego czasu wykorzystywane w badaniach ruchów molekularnych biomolekuł w ciele stałym.

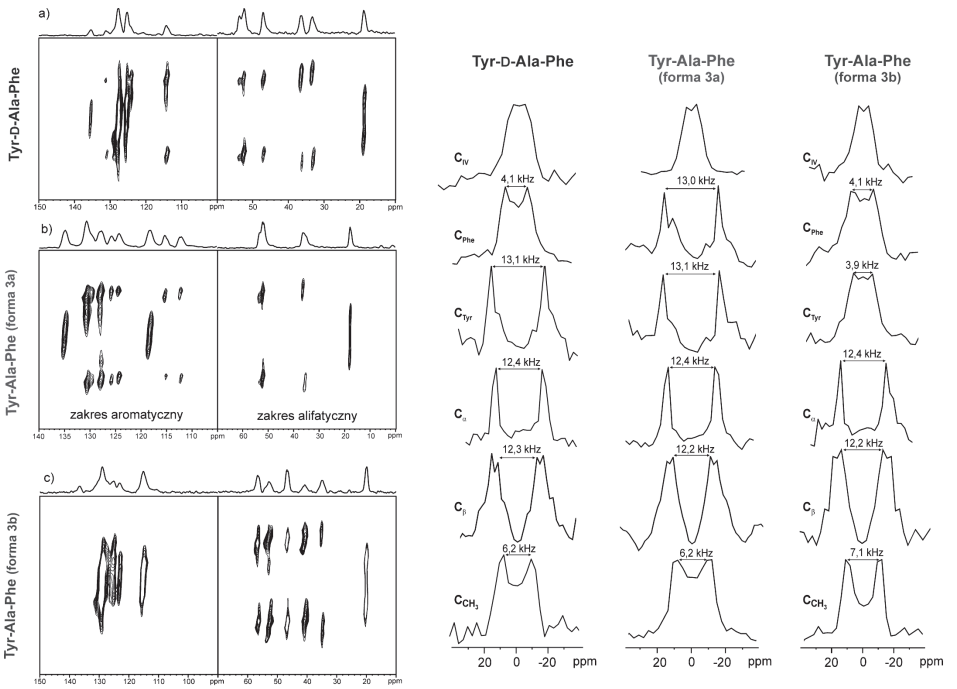


Rysunek 9. a) Dipolowy dublet Pake'a dla sprzężonej pary spinów (I-S) w polikrystalicznej próbce; odległość pomiędzy wierzchołkami dubletu d jest równa stałej sprzężenia dipolowego; b) wierzchołki dubletu odpowiadają sytuacji kiedy wektor I-S jest prostopadły ($\theta = 90°$) oraz równoległy ($\theta = 0°$) do wektora zewnętrznego pola magnetycznego (B_0); w przypadku kiedy wektor I-S jest zorientowany pod kątem $\theta = 54{,}7°$ do wektora B_0 sprzężenie dipolowe jest równe zero i nie ma wpływu na częstotliwość rezonansową [12]

Figure 9. a) Dipolar Pake pattern for two coupled spins (I-S) in a polycrystalline powder sample; the spacing between the points of maximum intensity d is equal to the dipolar coupling constant; b) the points with maximum intensity corresponds to the case where vector I-S is perpendicular ($\theta = 90°$) and parallel ($\theta = 0°$) to B_0; when the vector I-S is oriented to the vector B_0 at $\theta = 54{,}7°$ angle, the dipolar coupling is zero and does not influence on the resonance frequency [12]

W wyniku heterojądrowego sprzężenia dipolowego otrzymuje się charakterystyczny kształt linii rezonansowej nazywany dubletem Pake'a (Rys. 9) [12]. Odległość pomiędzy maksimami w tym dublecie jest równa stałej sprzężenia dipolowego – d. Typowa wartość stałej d dla izolowanej i statycznej pary spinów ^{1}H-^{13}C, w której

jądra oddalone są o 1,09 Å, wynosi 22,7 kHz. W eksperymentach PISEMA MAS i PILGRIM kształt linii widmowej przypomina klasyczny dublet Pake'a, a rozszczepienie w dublecie dipolowym dla układów statycznych jest równe 13,1 kHz. Jednak ze względu na to, że ruchy molekularne redukują sprzężenie dipolowe, odległość w dublecie i jego kształt mogą ulec zmianie, co wykazano na przykładzie analizowanych układów peptydowych.

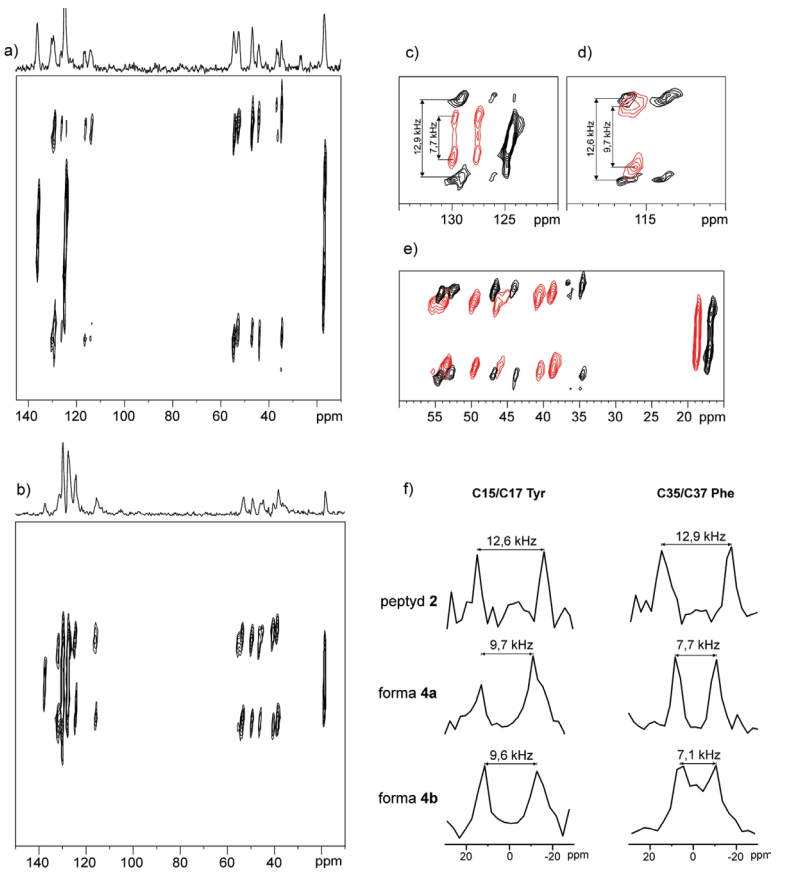


Rysunek 10. Zakres alifatyczny (10–60 ppm) i aromatyczny (105–150 ppm) widm 2D PISEMA MAS zarejestrowanych w temperaturze pokojowej z prędkością rotacji równą 13 kHz oraz projekcje F1 tripeptydów Tyr-D-Ala-Phe **1** i Tyr-Ala-Phe **3**

Figure 10. The aliphatic (10–60 ppm) and the aromatic region (105–150 ppm) of 2D PISEMA MAS spectrum recorded with a spinning rate of 13 kHz and F1 projection of tripeptide Tyr-D-Ala-Phe **1** and Tyr-Ala-Phe **3**

W przypadku tripeptydów z D- i L-alaniną zastosowana została sekwencja PISEMA MAS. Analiza dwuwymiarowych widm korelujących przesunięcia chemiczne jąder ^{13}C ze sprzężeniem dipolowym ^{1}H-^{13}C, a także projekcji F1 (Rys. 10), odzwierciedlających heterojądrowy dublet dipolowy wykazała, że pierścień tyrozyny tripeptydu **1** jest nieruchomy (d = 13,1 kHz), podczas gdy pierścień fenyloalaniny ulega szybkim ruchom (d = 4,1 kHz). Z kolei oba pierścienie formy **3a** tripeptydu **3** są statyczne, o czym świadczą wartości d dubletu, wynoszące dla tyrozyny i fenyloalaniny, odpowiednio, 13,1 kHz i 13,0 kHz. Fragmenty aromatyczne formy **3b** w przeciwieństwie do formy **3a** charakteryzują się znaczną dynamiką, co obrazują odległości pomiędzy wierzchołkami dubletu równe 4,1 kHz dla fenyloalaniny

i 3,9 kHz dla tyrozyny. Grupa metylowa alaniny we wszystkich analizowanych powyżej układach krystalicznych charakteryzuje się dynamiką o nieznacznie różniącej się częstotliwości, czego wynikiem są wartości d wynoszące dla tripeptydu **1** i formy **3a** 6,2 kHz, a dla formy **3b** 7,1 kHz. Zastosowany eksperyment, oprócz wglądu w dynamikę aromatycznych grup bocznych, umożliwia także analizę ruchów atomów C_α i C_β, które jak przedstawia Rysunek 10 charakteryzują się wartościami d odpowiadającymi układowi statycznemu (d = 12,2–12,4 kHz).



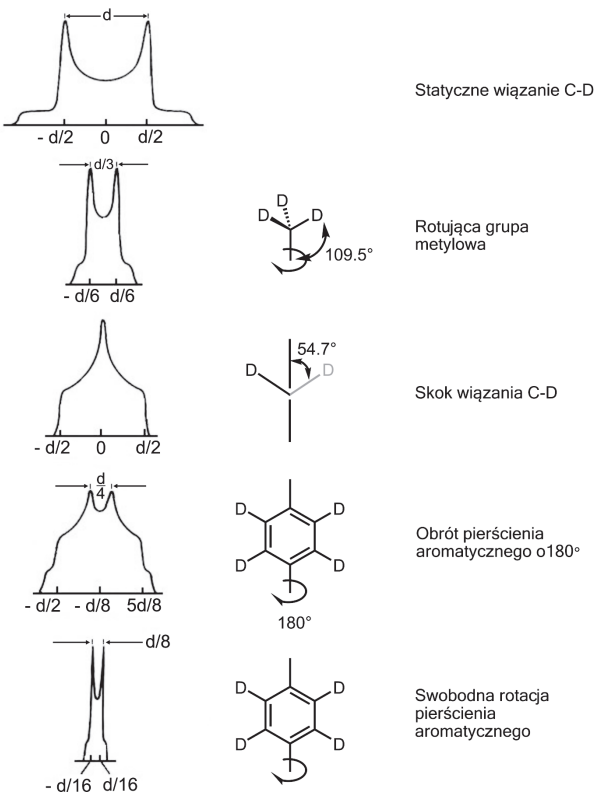
Rysunek 11. Widma 2D PILGRIM zarejestrowane w temperaturze pokojowej z prędkością rotacji równą 13 kHz: a) tetrapeptydu **2**, b) formy **4a**; porównanie obszarów: c) aromatycznych atomów pierścienia fenyloalaniny, d) aromatycznych atomów pierścienia tyrozyny, e) alifatycznych peptydu **2** (kolor czarny) i formy **4b** (kolor czerwony), f) projekcje F1 dla wybranych atomów węgla tetrapeptydu **2**, formy **4a** i **4b**

Figure 11. 2D PILGRIM spectra recorded at room temperature with a spinning rate of 13 kHz: a) tetrapeptide **2**, b) form **4a**; comparison of regions: c) aromatic – phenylalanine ring, d) aromatic – tyrozine ring, e) aliphatic – peptide **2** (black) and form **4b** (red), f) F1 projection for selected carbon atoms of tetrapeptide **2**, form **4a** and **4b**

Analiza porównawcza dwuwymiarowych widm PILGRIM i projekcji F1 wykazała, że pierścienie tyrozyny i fenyloalaniny tetrapeptydu **2** są statyczne, co potwierdzają wartości odległości pomiędzy wierzchołkami dubletu dipolowego, wynoszące, odpowiednio, 12,6 kHz i 12,9 kHz, jak również badania XRD. Wartości d dubletu dipolowego dla atomów węgla pierścieni fenyloalaniny form **4a** i **4b**, wynoszące, odpowiednio, 7,7 kHz i 7,1 kHz, wskazują na ruch typu „π-flip", co udowodniła również Hong i współpracownicy na przykładzie wolnej fenyloalaniny [11]. Z kolei odległości d dla atomów węgla pierścieni tyrozyny form **4a** i **4b** przyjmują wartość pośrednią (odpowiednio 9,7 kHz i 9,6 kHz), która sugeruje obecność niewielkich drgań tych grup, ale wyklucza obrót typu „π-flip".

2.2. BADANIE DYNAMIKI PIERŚCIENI AROMATYCZNYCH SELEKTYWNIE ZNAKOWANYCH TRIPEPTYDÓW Tyr-D-Ala-Phe I Tyr-Ala-Phe ZA POMOCĄ REZONANSU DEUTEROWEGO [6]

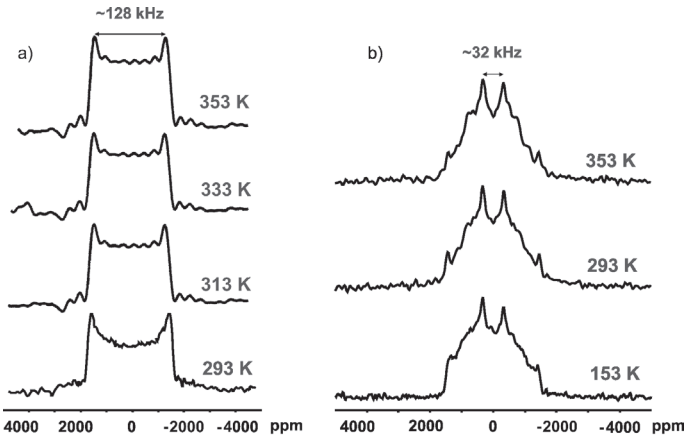
Uzupełnieniem badań procesów dynamicznych zachodzących w cząsteczkach modelowych peptydów w fazie stałej było zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądra deuteru. Zaletą tej metody jest fakt, że widmo deuterowe jest zazwyczaj proste i odzwierciedla zachowanie tylko wiązań C-^{2}H. Dodatkowym atutem tej techniki jest stosunkowo krótki czas rejestracji widma statycznego, ponieważ oddziaływania kwadrupolowe w znakomity sposób przyspieszają relaksację. Pomimo tego, że statyczne widma ^{2}H NMR charakteryzują się szeroką linią rezonansową, analiza ich kształtu dostarcza szczegółowych informacji o rodzaju ruchu wybranych fragmentów cząsteczki (Rys. 12), a także o zakresie jego częstotliwości (10^3–10^6 Hz). W przypadku układu statycznego kształt linii odpowiada typowemu dubletowi kwadrupolowemu, w którym odległość pomiędzy wierzchołkami d wynosi 128 kHz. W miarę zwiększania częstotliwości ruchów kształt tego dubletu ulega zmianie, a odległość pomiędzy jego wierzchołkami zmniejsza się. W sytuacji gdy pierścień aromatyczny podlega obrotowi o 180° odległość między wierzchołkami jest równa 1/4 odległości dla układu statycznego, natomiast podczas swobodnej rotacji pierścienia fenylowego wokół osi 1,4 – wynosi 1/8 d.



Rysunek 12. Teoretyczne kształty linii widma deuterowego dla różnych typów ruchu analizowanego układu [13]

Figure 12. The theoretical line shapes of deuterium spectrum for variety type of motion of analyzed structure [13]

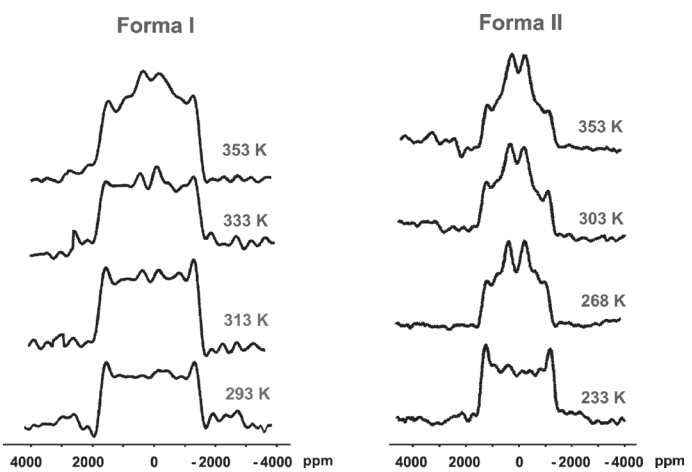
Układy modelowe: Tyr^{d4}-D-Ala-Phe **5**, Tyr-D-Ala-Phe^{d5} **6**, Tyr^{d4}-Ala-Phe **7**, Tyr-Ala-Phe^{d5} **8** posłużyły do wykonania pomiarów z wykorzystaniem sekwencji echa kwadrupolowego bez rotacji próbki oraz analizy kształtu linii w funkcji temperatury. Statyczne widma ^{2}H NMR tripeptydów **5** i **6** zaprezentowane na Rysunku 13 pokazują, że pierścień tyrozyny nie ulega procesom dynamicznym. Kształt linii odpowiada typowemu dubletowi kwadrupolowemu, w którym odległość pomiędzy wierzchołkami wynosi około 128 kHz. Z kolei pierścień fenyloalaniny obraca się o 180° wokół osi 1,4 w bardzo szerokim zakresie temperatur (153–353 K), co potwierdza kształt linii charakterystyczny dla tego typu ruchu.



Rysunek 13. Widma ^{2}H QUADECHO tripeptydów: a) Tyr^{d4}-D-Ala-Phe **5** zarejestrowane w zakresie temperatur 293 - 353 K i b) Tyr-D-Ala-Phe^{d5} **6** zarejestrowane w zakresie temperatur 153–353 K

Figure 13. ^{2}H QUADECHO spectra of tripeptides: a) Tyr^{d4}-D-Ala-Phe **5** recorded at temperature range 293–353 K and b) Tyr-D-Ala-Phe^{d5} **6** recorded at temperature range 153–353 K

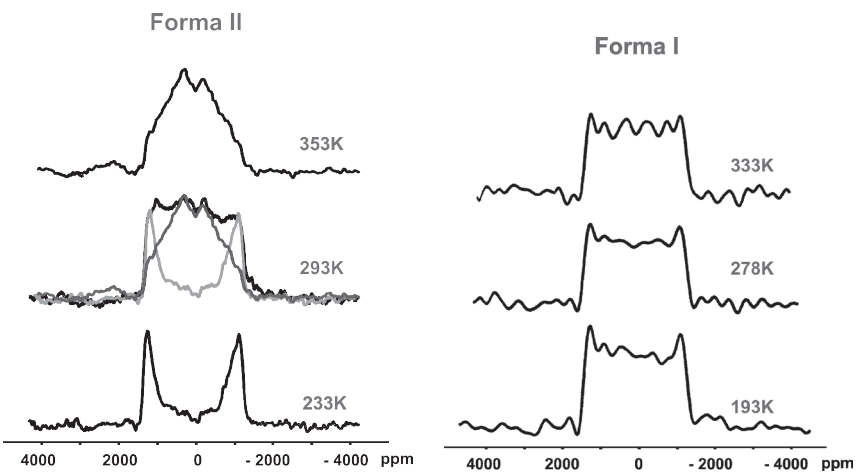
Z pomiarów „solid echo" dwóch form tripeptydu **7** wykonanych w kilku temperaturach wynika, że pierścień tyrozyny formy I jest statyczny w temperaturze 293 K, jednak wraz z jej wzrostem zwiększa się jego dynamika (Rys. 14). Bardziej oczywista jest sytuacja w przypadku formy II. Jak wynika z kształtu linii w temperaturze 233 K pierścień nie podlega procesom dynamicznym, natomiast już w temperaturze 268 K i wyższej zaczyna obracać się o 180° wokół osi 1,4 (Rys. 14).



Rysunek 14. Widma ^{2}H QUADECHO dwóch form tripeptydu Tyr^{d4}-Ala-Phe **7**, zarejestrowane w zakresie temperatur 233–353 K

Figure 14. ^{2}H QUADECHO spectra of two forms of tripeptide Tyr^{d4}-Ala-Phe **7** recorded at temperature range 233–353 K

Z analizy kształtu linii statycznych widm ^{2}H NMR dwóch form tripeptydu **8** przedstawionych na Rysunku 15 wynika, że pierścień tyrozyny formy I nie podlega procesom dynamicznym w analizowanym zakresie temperatur (nieznaczne drgania tego fragmentu cząsteczki pojawiają się w temperaturze 333 K). W przypadku formy II pierścień fenyloalaniny w temperaturze 233 K jest statyczny. Wykonując pomiar w temperaturze 293 K obserwuje się kształt linii powstały w wyniku nałożenia linii rezonansowych odpowiadających statycznej i rotującej grupie fenylowej. Jak wynika z badań XRD w asymetrycznej części komórki elementarnej znajdują się dwie cząsteczki peptydu **3**. Można zatem wnioskować, że dwie nierównocenne magnetycznie cząsteczki posiadają odmienną dynamikę w ciele stałym: w 293 K jeden z pierścieni fenylowych wykonuje obroty o 180°, a drugi jest statyczny. W temperaturze 353 K oba pierścienie zaczynają rotować, co potwierdza jednoznacznie kształt linii widma deuterowego (Rys. 15). Taki przypadek jest znany. Sparks i współpracownicy udowodnili zróżnicowaną dynamikę łańcucha bocznego dwóch molekuł metioniny przy użyciu rezonansu deuterowego [14].



Rysunek 15. Widma ^{2}H QUADECHO dwóch form tripeptydu Tyr-Ala-Phe^{d5} **8**, zarejestrowane w zakresie temperatur 193–353 K

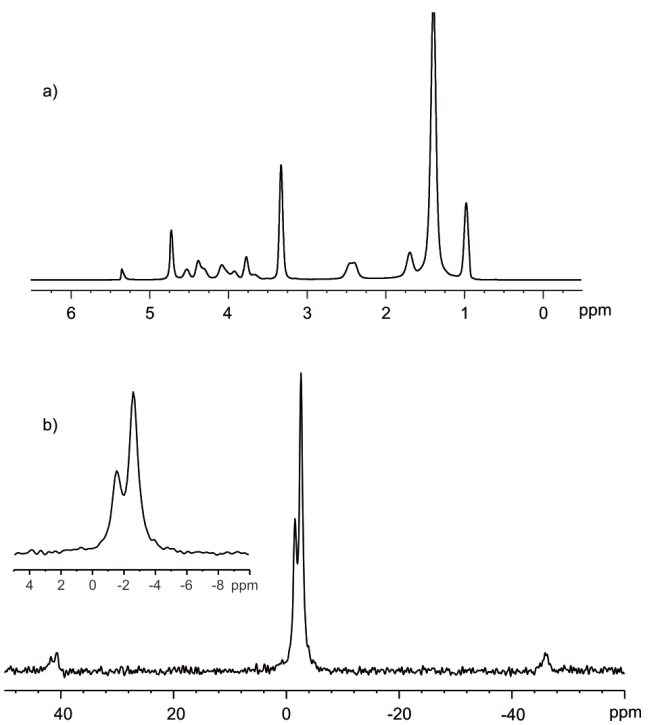
Figure 15. ^{2}H QUADECHO spectra of two forms of tripeptide Tyr-Ala-Phe^{d5} **8** recorded at temperature range 233–353 K

3. BADANIE ODDZIAŁYWANIA ZNAKOWANEGO IZOTOPOWO TETRAPEPTYDU Tyr-D-Ala-Phe-Gly Z BŁONĄ FOSFOLIPIDOWĄ [7]

Ostatni etap prezentowanej pracy doktorskiej dotyczył poszukiwania odpowiedniej metodologii umożliwiającej wyznaczenie konformacji i lokalizacji *N*-terminalnej sekwencji dermorfiny – tetrapeptydu Tyr-D-Ala-Phe-Gly w środowisku biomimetycznym, które stanowiła błona fosfolipidowa. Zdefiniowanie konformacji aktywnej w przypadku peptydów opioidowych w układach białek mem-

branowych, do których należą receptory opioidowe, nie jest zadaniem łatwym, z powodu trudności z krystalizacją receptorów GPCR. W związku z tym coraz częściej prace badawcze zmierzające do określenia konformacji tych związków prowadzone są środowisku najlepiej imitującym naturalne warunki w komórce, czyli w obecności błon fosfolipidowych, które, jak wynika z doniesień literaturowych, w kontakcie z peptydem wymuszają jego bioaktywną konformację.

W pierwszej kolejności został przygotowany odpowiedni układ biomimetyczny, składający się z mieszaniny fosfolipidów DMPC i DMPG w stosunku 10:3. Skład takiego modelu błony wybrano na podstawie doniesień literaturowych, z których wynika, że taka kompozycja fosfolipidów jest optymalna do badania oddziaływań z peptydami posiadającymi aromatyczne i alifatyczne reszty aminokwasowe [15]. Charakterystyki tego układu dokonano na podstawie widm protonowych i fosforowych wykonanych techniką HR MAS (ang. *High Resolution Magic Angle Spinning*) (Rys. 16).

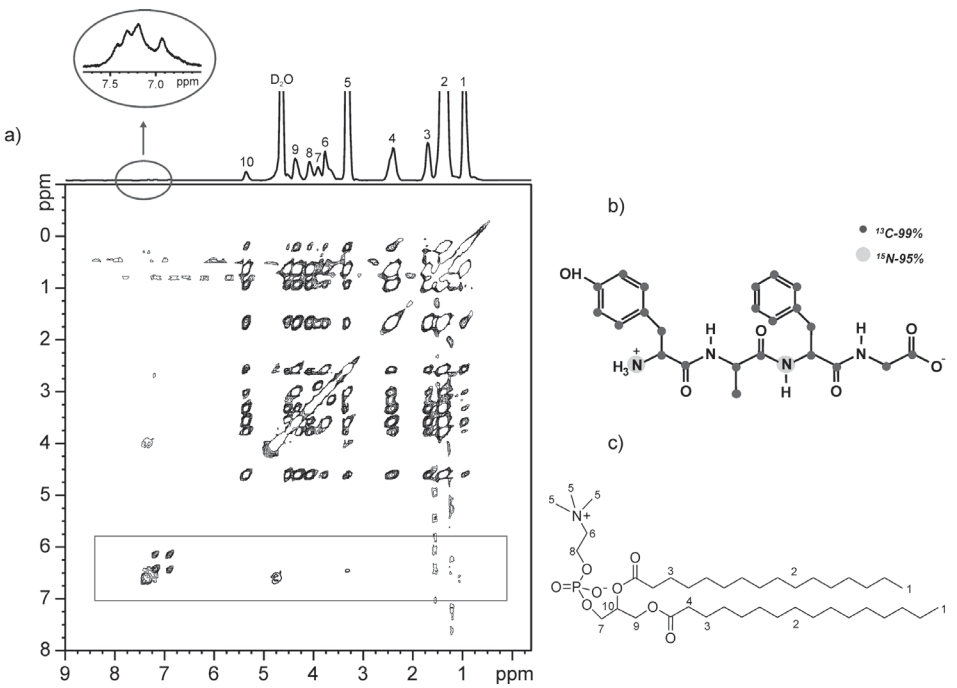


Rysunek 16. Widma: a) ^{1}H HR MAS NMR membrany DMPC : DMPG (10:3) zarejestrowane z prędkością rotacji 5 kHz, w temperaturze 303 K, b) ^{31}P HR MAS NMR zarejestrowane z prędkością rotacji 7 kHz, w temperaturze 273 K

Figure 16. The spectra: a) ^{1}H HR MAS NMR of DMPC : DMPG (10:3) membrane recorded with a spinning rate of 5 kHz at 303 K, b) ^{31}P HR MAS NMR recorded with a spinning rate of 7 kHz at 273 K

Następnie w przygotowanej błonie umieszczono znakowany izotopowo peptyd **2'** w celu określenia jego lokalizacji i konformacji. Jednym z eksperymentów

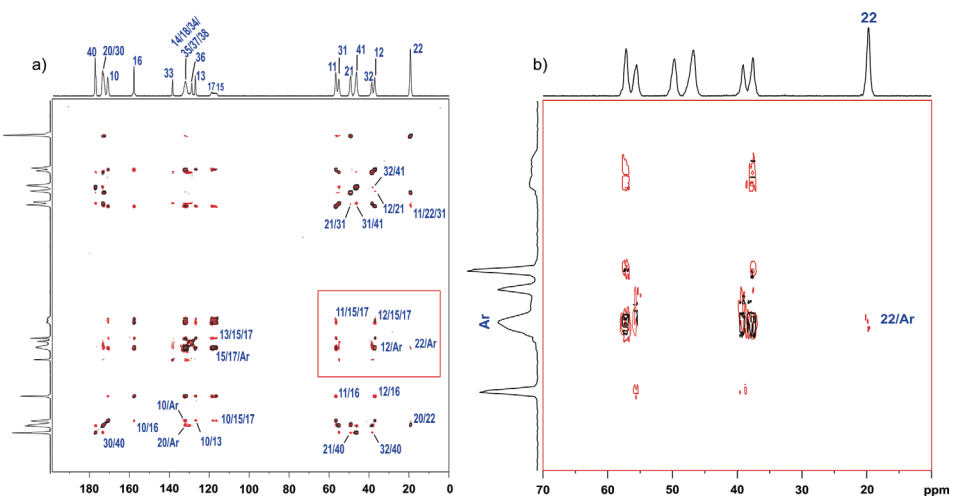
umożliwiających tego typu badania jest ^{1}H-^{1}H RFDR MAS (ang. *Radio Frequency Driven Dipolar Recoupling*), który jest modyfikacją klasycznego eksperymentu NOESY (ang. *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*), polegającą na wprowadzeniu serii impulsów π zsynchronizowanych z prędkością rotora [16]. Zastosowanie tych dodatkowych impulsów przyspiesza komunikację spinów, zwiększając intensywność pików korelacyjnych i skracając czas pomiaru. Widmo RFDR MAS układu DMPC:DMPG:peptyd **2'** zawiera intensywne sygnały pochodzące od protonów fosfolipidów (Rys. 17). Dodatkowo zaobserwować można piki korelacyjne od protonów aromatycznych tetrapeptydu. Niestety, ze względu na niewielką ilość tego peptydu w układzie fosfolipidowym (2%) próba wizualizacji jego pików korelacyjnych z protonami fosfolipidów jest utrudniona z powodu szumów w zakresie 1–2 ppm. Bardziej diagnostyczny jest rejon widma przedstawiający piki korelujące protony fragmentów aromatycznych peptydu z protonami wody (4,6 ppm) i grup metylowych choliny (5), które sugerowałyby, że analizowany tetrapeptyd znajduje się najprawdopodobniej na powierzchni błony. Jak pokazuje literatura taką właśnie tendencję umiejscawiania się w membranach mają peptydy o małych masach cząsteczkowych (np. enkefalina) [17].



Rysunek 17. a) Widmo ^{1}H-^{1}H RFDR MAS układu DMPC:DMPG:peptyd **2'**, zarejestrowane przy czasie mieszania równym 50 ms z prędkością rotacji 7 kHz, w temperaturze 308 K; schemat: b) cząsteczki znakowanego tetrapeptydu **2'**, c) fosfolipidu DMPC

Figure 17. a) ^{1}H-^{1}H RFDR MAS spectrum of DMPC:DMPG:peptide **2'** recorded with a mixing time equal to 32 ms with a spinning rate of 7 kHz at 308 K; the scheme of: b) the labeled tetrapeptide **2'**, c) phospholipid DMPC

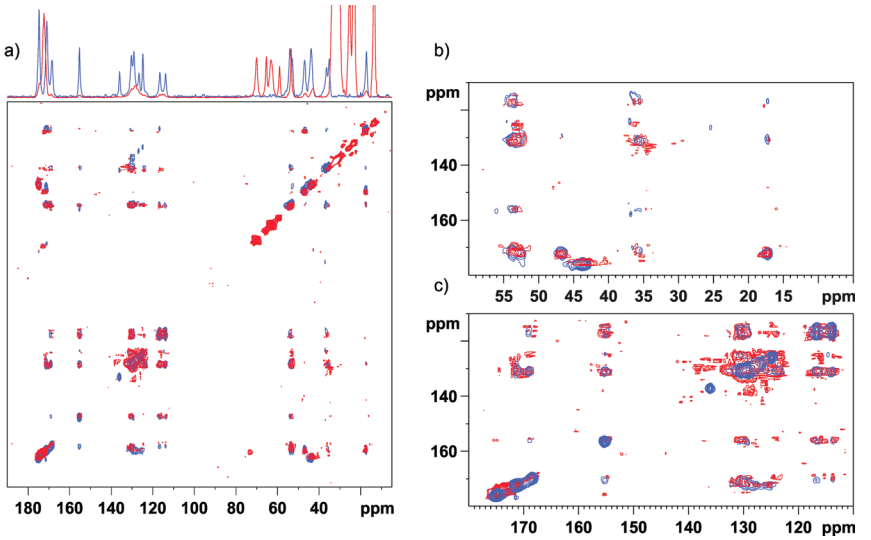
W wielu przypadkach zakłada się *a priori* podobieństwo konformacyjne układów w różnych stanach skupienia, dlatego próbując określić konformację aktywną peptydu **2'** w układzie fosfolipidowym należy wziąć pod uwagę fakt, że środowisko biomimetyczne może wymuszać zupełnie inną konformację peptydu. W związku z tym przeprowadzono analizę porównawczą konformacji peptydu **2'** przed i po wprowadzeniu go do błony fosfolipidowej. W tym celu najwygodniej jest zastosować te same sekwencje impulsowe. Mając do dyspozycji różne techniki spektroskopii SS NMR, używane do wyznaczania odległości pomiędzy sprzęgającymi się przez przestrzeń jądrami ^{13}C, wykorzystano eksperyment PARIS (ang. *Phase-Alternated Recoupling Irradiation Scheme using orthogonal radio-frequency phases*) [18], od niedawna używany do badań strukturalnych biomolekuł. Umożliwił on obserwację oddziaływań dipolowych pomiędzy jądrami ^{13}C z uwzględnieniem istotnych kontaktów grupy metylowej alaniny C22 z pierścieniami aromatycznymi tyrozyny i fenyloalaniny, przy wydłużeniu czasu kontaktu do 256 ms (Rys. 18). Obserwacje te są w pełni zgodne z danymi rentgenostrukturalnymi. Niestety w przypadku układu modelowego błona–peptyd **2'** analogiczny eksperyment nie dostarczył jednoznacznych informacji na temat topologii peptydu w środowisku biomimetycznym.



Rysunek 18. Obraz będący nałożeniem dwóch widm ^{13}C-^{13}C PARIS mieszaniny peptydów **2** i **2'** (9:1) wykonanych przy różnych czasach mieszania: τ_m = 64 ms (czarne piki korelacyjne) oraz τ_m = 256 ms (czerwone piki korelacyjne), zarejestrowane w temperaturze 273 K z prędkością rotacji 20 kHz: a) cały zakres spektralny ^{13}C, b) wybrany fragment

Figure 18. Comparison of two spectra ^{13}C-^{13}C PARIS peptides **2** and **2'** mixture (9:1) recorded with various mixing time: τ_m = 64 ms (black correlation peaks) and τ_m = 256 ms (red correlation peaks), recorded with a spinning rate of 20 kHz at 273 K: a) full range of ^{13}C spectra, b) selected fragment

Zdecydowanie lepsze rezultaty uzyskano wykorzystując sekwencję DARR. Analizując widma otrzymane tą techniką widać, że większość pików korelacyjnych pochodzących od peptydu **2'** i układu błona–peptyd pokrywa się (wyjątek stanowią dwa piki przy δ = 48 ppm i 52 ppm od sygnałów atomów C41 i C21).



Rysunek 19. Obraz będący nałożeniem dwóch widm ^{13}C-^{13}C DARR: mieszaniny peptydów **2** i **2'** (9:1) (niebieskie piki korelacyjne) i układu DMPC : DMPG : peptyd **2'** (czerwone piki korelacyjne) wykonanych przy τ_m = 128 ms, w temperaturze 273 K z prędkości rotacji 10 kHz: a) cały zakres spektralny ^{13}C, b) obszar alifatyczny projekcji F2, c) obszar aromatyczny projekcji F2

Figure 19. Comparison of two spectra ^{13}C-^{13}C DARR: peptides **2** and **2'** mixture (9:1) (blue correlation peaks) and DMPC : DMPG : peptyd **2'** (red correlation peaks) recorded with a spinning rate of 10 kHz, τ_m = 128 ms at 273 K: a) full range of ^{13}C spectra, b) the aliphatic region of F2 projection, c) the aromatic region of F2 projection

PODSUMOWANIE

Badania X-Ray wykazały, że zarówno tripeptyd Tyr-Ala-Phe **3**, jak i tetrapeptyd Tyr-Ala-Phe-Gly **4** z łatwością tworzą różne formy krystaliczne. Wynika z tego, że związki te charakteryzują się większą swobodą konformacyjną niż analogiczne peptydy posiadające w strukturze D-alaninę. Można więc przypuszczać, że jednym z ważniejszych czynników wpływających na proces „preorganizacji" poprzedzający tworzenie kryształu jest obecność wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań CH-π pomiędzy pierścieniami aromatycznymi tyrozyny i/lub fenyloalaniny a grupą metylową alaniny. Jak wykazały badania rentgenograficzne tego typu interakcje możliwe są tylko w przypadku analizowanych przeze mnie układów posiadających alaninę o konfiguracji D. Fakt ten tłumaczyłby rolę D-alaniny w sekwencji sygnałowej dermorfiny, jak również brak aktywności biologicznej syntetycznych pochodnych zawierających enancjomer L tego aminokwasu. Można spekulować, że takie interakcje występują również podczas kontaktu liganda z receptorem opioidowym, zmniejszając labilność konformacyjną peptydu, a przez to zwiększając jego selektywność.

Pomiary ^{13}C CP-MAS potwierdziły istnienie: jednej formy krystalicznej tetrapeptydu Tyr-D-Ala-Phe-Gly **2** i dwóch w przypadku analogu Tyr-Ala-Phe-Gly

4 oraz peptydu Tyr-Ala-Phe **3**. Ponadto na podstawie analizy widm ^{1}H UF MAS i temperaturowych widm ^{13}C CP-MAS wykazano nieodwracalne przejście formy **4b** tetrapeptydu Tyr-Ala-Phe-Gly w formę **4a**.

W oparciu o eksperymenty PISEMA MAS i PILGRIM wykazano, że łańcuch główny tri- i tetrapeptydów z D- i L-alaniną jest usztywniony, a dynamika molekularna związana jest z ruchem pierścieni aromatycznych tyrozyny i fenyloalaniny.

Analiza kształtu linii statycznych widm deuterowych tripeptydów **5**, **6**, **7**, **8**, w których jeden z pierścieni aromatycznych zawierał atomy deuteru, potwierdziła zróżnicowanie procesów dynamicznych pierścieni w łańcuchach bocznych tych aminokwasów i dodatkowo umożliwiła zdefiniowanie ich ruchu jako „π-flip".

Badania tetrapeptydu **2'** w środowisku biomimetycznym pozwoliły na dopracowanie procedury przygotowania błony fosfolipidowej i jej charakterystyki za pomocą eksperymentów ^{1}H i ^{31}P HR MAS, a także umożliwiły jedynie na sformułowanie przypuszczenia, że peptyd **2'** znajduje się na powierzchni błony fosfolipidowej (^{1}H-^{1}H RFDR MAS). Analiza widm otrzymanych techniką DARR wykazała dużą zgodność pików korelacyjnych pochodzących od peptydu i układu peptyd–błona. Można zatem przypuszczać, że konformacja tetrapeptydu Tyr-D--Ala-Phe-Gly, określona za pomocą technik w ciele stałym jest zbliżona do tej, którą przyjmuje podczas kontaktu z układem fosfolipidowym. W tym miejscu warto przypomnieć, że w sieci krystalicznej tetrapeptyd **2** przyjmuje konformację „pseudocykliczną". Obecność cząsteczki wody, która poprzez wiązania wodorowe spina *N*- i *C*-końce peptydu wydaje się kluczowa. Podobieństwo konformacyjne tetrapeptydu w formie krystalicznej i po wbudowaniu w błonę DMPC : DMPG sugeruje, że woda również w układzie biomimetycznym pełni funkcję medium sprzęgającego. Wynik ten można traktować jako kolejny argument potwierdzający, iż występujący w postaci jonu obojnaczego fragment Tyr-D-Ala-Phe-Gly, ulokowany jest w hydrofilowym obszarze błony.

Rozwijanie metodologii spektroskopii NMR w ciele stałym w badaniach produktów naturalnych i syntetycznych połączeń bioorganicznych stanowi element szerszej strategii badawczej od wielu lat realizowanej w Samodzielnej Pracowni Badań Strukturalnych CBMiM PAN. W związku z tym wartym podkreślenia jest fakt, że eksperymenty PILGRIM, PISEMA MAS, DCP, DARR czy PARIS, wykorzystane do prezentowanych badań, zostały wykonane po raz pierwszy w Polsce, a opublikowane prace NMR w ciele stałym dotyczące tej tematyki pochodzą wyłącznie z grupy prof. Marka Potrzebowskiego.

PODZIĘKOWANIA

Praca była realizowana w ramach grantu finansowanego przez MNiSzW pt. „Spektroskopia NMR w fazach nieizotropowych – rozwój metodologii, nowe zastosowania".

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] V. Erspamer, Int. J. Dev. Neurosci., 1992, **10**, 3.
[2] A. Jilek, G. Kreil, Monatsh. Chem., 2008, **139**, 1.
[3] M.M Słabicki, M.J. Potrzebowski, G. Bujacz, S. Olejniczak, J.J. Olczak, Phys. Chem. B, 2004, **108**, 4535.
[4] K. Trzeciak-Karlikowska, A. Bujacz, W. Ciesielski, G.D. Bujacz, M. J. Potrzebowski, J. Phys. Chem. B, 2011, **115**, 9910.
[5] K. Trzeciak-Karlikowska, A. Jeziorna, W. Ciesielski, A. Bujacz, G.D. Bujacz, J. Gajda, D. Pentak, M.J. Potrzebowski, Cryst. Growth Des., 2009, **9**, 4051.
[6] T. Pawlak, K. Trzeciak-Karlikowska, W. Ciesielski, M. J. Potrzebowski, J. Phys. Chem. B, 2012, **116**, 1974.
[7] A. Jeziorna, T. Pawlak, K. Trzeciak-Karlikowska, P. Paluch, M.J. Potrzebowski, BBA-Biomembranes, 2012, **1818**, Issue 11, 2579.
[8] K. Takegoshi, S. Nakamura, T. Terao, Chem. Phys. Lett., 2001, **344**, 631.
[9] J.-H. Yang, F.-C. Chou, D.-L.M. Tzou, J. Mag. Reson., 2008, **195**, 116.
[10] A. Ramamoorthy, Y. Wei, D.K. Lee, Ann. R. NMR S., 2004, **52**, 1.
[11] M. Hong, X. Yao, K.. Jakes, D. Huster, J. Phys. Chem. B 2002, **106**, 7355.
[12] D.D. Laws, H.-M.L. Bitter, A. Jerschow, Angew. Chem. Int. Ed., 2002, **41**, 3096.
[13] R.A. Komorowski, *High Resolution NMR Spectroscopy of Synthetic Polymers in Bulk*, VCH Publishers Inc., Deerfield Beach, 1989.
[14] S.W. Sparks, N. Budhu, P.E. Young, D.A. Torchia, J. Am. Chem. Soc., 1988, **110**, 3359.
[15] W. Zhang, E. Crocker, S. McLaughin, S.O. Smith, J. Biol. Chem., 2003, **278**, 21459.
[16] D. Aucoin, D. Camenares, X. Zhao, J. Jung, T. Sato, S.O. Smith, J. Magn. Reson., 2009, **197**, 77.
[17] S. Sul, Y. Feng, U. Le, D.J. Tobias, N.-H. Ge, J. Phys. Chem. B , 2010, **114**, 1180.
[18] M. Weingarth, G. Bodenhausen, P. Tekely, Chem. Phys. Lett., 2010, **488**, 10.

Praca wpłynęła do Redakcji 23 lipca 2012