



Doctoral Thesis

Chiral fatty acid vesicles and peptide/vesicle complexes

Author(s):

Morigaki, Kenichi

Publication Date:

1998

Permanent Link:

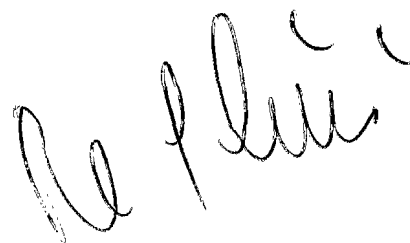
<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001923821> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 12574



Chiral Fatty Acid Vesicles and Peptide/Vesicle Complexes

A dissertation submitted to
Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Kenichi Morigaki
M. Eng. University of Tokyo
born September 13, 1967
citizen of Osaka, Japan

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Pier Luigi Luisi, examiner
Prof. Dr. Martin Quack, co-examiner
Prof. Dr. Peter Walde, co-examiner

Zürich 1998

A) ABSTRACT AND ZUSAMMENFASSUNG

Abstract

This thesis consists of two studies that were conducted to extend recently introduced model systems of "autopoietic self-reproduction". In these systems, vesicles formed by fatty acid molecules are generated in an autocatalytic manner by the hydrolysis of their precursor molecules; fatty anhydride.

In the first part of the thesis, the autocatalytic formation of vesicles was investigated using chiral fatty acids with the aim of clarifying whether the process shows stereoisomeric effects. The aggregation properties of various α -substituted fatty acids in water were studied, and it was found that 2-methylauric acid (2ML) and 2-methyloleic acid (2MO) formed stable vesicle suspensions in the pH region where approximately 50-70 % of the carboxyl groups were ionized. In comparison with straight-chain fatty acids, the presence of the methyl side chain affected the thermal phase transition temperature (T_c) and the aggregation properties significantly. For example, lauric acid did not form a stable vesicle suspension at room temperature (it precipitated out as acid-soap 1:1 crystals), whereas under the same conditions, 2ML formed stable vesicle suspensions because the bilayers were in the fluid-analogue state ($> T_c$).

Chiral properties of the 2ML-vesicles were studied by differential scanning calorimetry (DSC) and circular dichroism (CD) using enantiomerically pure (R)- and (S)-2ML. The experimentally determined binary phase diagram of the bilayers (T_c measured as a function of enantiomeric composition) indicated that the crystalline structure of the racemate below T_c was the racemic compound, where both enantiomers were present in the same unit cell of the crystal. In other words, 2ML has a strong tendency to form an R-S heterochiral pair in the solid-analogue state. The CD signal of 2ML vesicles was rather small and depended on the degree of protonation of the carboxyl groups; corresponding measurements indicated that the induction of an asymmetric microenvironment in the bilayers was rather weak.

For the studies on the autocatalytic vesicle formation, the hydrolysis of water-insoluble 2-methylauric anhydride (2MLA) was investigated in a biphasic system consisting of an aqueous phase and 2MLA. The stereoisomeric effects during the hydrolysis reaction were studied by comparing first the behaviours of homochiral and racemic vesicles (vesicles containing a racemic mixture of 2ML). While there was no observable difference in the rate of hydrolysis at 25°C between homochiral and racemic vesicles, a clear effect was observed at 10°C: racemic vesicles destabilized during hydrolysis, causing phase separation (a gel-like material precipitated), whereas homochiral vesicles remained stable and continued to catalyze their own formation. The precipitation of the racemate was further studied as a potential mechanism to enrich the enantiomeric excess in the vesicle suspensions. Starting from a non-racemic mixture, the hydrolysis of 2MLA in the presence of 2ML vesicles resulted in a slight enantiomeric enrichment in the vesicles.

A comparative study was conducted using a gel system of dibenzoyl-cystine (DBC). The enantiomeric DBC formed a gel in water at a concentration greater than 1.3 mM, whereas the racemate precipitated under identical condition. Using the precipitation of the racemate, the enantiomeric excess of a non-racemic mixture of DBC could be enriched to almost 100% enantiomeric purity.

The enantioselectivity of the chiral fatty acid vesicle system was investigated by comparing the hydrolysis rates of enantiomeric 2MLA ((RR)-2MLA and (SS)-2MLA) in the presence of homochiral vesicles (either (R)-2ML or (S)-2ML). The reaction rates of the two enantiomeric anhydrides were the same within experimental error, indicating that the vesicles from simple chiral fatty acids cannot induce significant enantioselectivity.

In the second part of the thesis, it has been aimed to combine functional entities to the "autopoietic self-reproduction" of fatty acid vesicles by incorporating guest molecules. A relatively hydrophobic tripeptide, Z-Phe-His-Leu (Z-FHL), was employed as the guest molecule. The association properties of Z-FHL with oleic acid vesicles were studied by equilibrium dialysis and CD. From the equilibrium dialysis experiments, the association constant at pH 8.5 was estimated to be 21.2 (M⁻¹). The CD spectra indicated that the peptide was associated at a relatively polar region of the bilayers.

As a measure of the functionality of the vesicle/peptide complex, its catalytic activity was studied by using *p*-nitrophenyl carboxylate substrates. The oleic acid Z-FHL/vesicle complex showed a considerable rate enhancement for the hydrolysis of the hydrophobic substrate *p*-nitrophenyl palmitate (PNP-C16). In contrast, the rate enhancement was minimal for the hydrophilic substrate *p*-nitrophenyl acetate (PNP-C2). It is evident that oleic acid vesicles act as a host system that provides a hydrophobic domain where catalyst and hydrophobic substrate are concentrated. This is indicated by the dependence of the vesicle catalyzed reaction rate of PNP-C16 on the oleic acid concentration. The trend was similar to the micelle catalyzed bimolecular reactions. On the other hand, the plot of the vesicle catalyzed hydrolysis rate versus the substrate concentration exhibited a Michaelis-Menten like saturation behaviour. Although the mechanism for this saturation behaviour was not clear, an attempt was made to draw an analogy between the oleic acid Z-FHL/vesicle complex and enzymes whose activity could be modulated by the presence of an activator.

Finally, experiments were carried out where the autocatalytic vesicle formation was combined with the incorporation of the peptide molecules. The model reaction employed was the hydrolysis of oleic anhydride in a biphasic system consisting of an aqueous phase and a neat oleic anhydride phase. If the reaction was carried out in the absence of the peptide, the formation of oleic acid vesicle induced enhancement of the catalytic activity in the aqueous phase, as evidenced by the acceleration of the hydrolysis of PNP-C16. This observation suggests that oleic acid vesicles themselves carry certain characteristics of a catalyst. The catalytic activity was enhanced even more significantly upon vesicle formation, if the peptide was present in the aqueous phase. It is most likely that the enhancement in catalytic activity follows from the incorporation of peptide molecules into the bilayers upon vesicle formation. These results indicate that "self-reproducing" entities such as vesicles could possibly be combined with other functional elements in order to evolve towards higher complexity and functionality.

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation besteht aus zwei Studien, deren Idee es war, das Modellsystem von "autopoietischer Selbst-Reproduktion" zu erweitern. In diesem System wurden Vesikeln aus Fettsäuren verwendet, die durch einen autokatalytischen Prozess aufgrund der Hydrolyse von Vorläufermolekülen, den Fettsäureanhydriden, gebildet wurden.

Im ersten Teil der Dissertation wurde die autokatalytische Bildung von Vesikeln aus chiralen Fettsäuren untersucht, um abzuklären, ob der Prozess enantioselektiv ist. Die Aggregationseigenschaften der verschiedenen α -substituierten Fettsäuren in wässrigem Medium wurden untersucht, und es ist klar geworden, dass 2-Methylaurinsäure (2ML) und 2-Methylölsäure (2ML) in bestimmten pH Bereichen stabile Vesikel-Suspensionen bilden, und zwar dort, wo ungefähr 50-70% der Carbonsäure ionisiert ist. Die Methylgruppe hat die Phasenübergangstemperaturen (T_c) und die Aggregationseigenschaften stark beeinflusst. Bei Laurinsäure zum Beispiel hat sich bei Raumtemperatur keine stabile Vesikel-Suspension gebildet (sie ist als 1:1 Säure-Seife Kristalle ausgefallen). Bei 2ML hingegen haben sich stabile Vesikel-Suspensionen gebildet, da die Doppelschichten im flüssig-analogen Zustand waren ($>T_c$).

Die chiralen Eigenschaften der Vesikeln wurden calorimetrisch mittels der DSC ("Differential scanning calorimetry") und Zirkulardichroismus (CD) mit den Enantiomeren (T_c wurde von verschiedenen (R)- und(S)-2ML Mischungen bestimmt) (R)- und(S)-2ML untersucht. Das Zweikomponenten-Phasendiagramm hat gezeigt, dass die Struktur der Kristalle des Racemats unterhalb T_c eine racemische Verbindung ist, wobei die beiden Enantiomeren sich in einer Zelle des Kristalls befinden. Das heisst, dass 2ML eine starke Tendenz hat, das homochirale *R-S* Paar im Festkörper-analogen Zustand zu bilden. Die CD Signale von 2ML Vesikeln waren eher klein und vor allem abhängig vom Protonierungsgrad der Carbonsäure. Die CD-Messungen haben gezeigt, dass die Induktion einer asymmetrischen Umgebung in den Doppelschichten eher klein ist.

Für die Studien über die autokatalytische Vesikelbildung wurde die Hydrolyse des Wasser-unlöslichen 2-Methylaurinsäureanhydrids (2MLA) in einem biphasischen System untersucht, welches aus einer wässrigen Phase und 2MLA bestand. Zuerst wurden die stereoisomerischen Effekte

untersucht, und zwar indem das Verhalten der homochiralen und racemischen Vesikeln verglichen wurde. Obwohl bei 25°C keine beobachtbare Differenz in den Geschwindigkeiten vorhanden war, wurde bei 10°C ein klarer Effekt beobachtet: die racemischen Vesikeln destabilisierten sich während der Hydrolysereaktion und fielen als gelartige Masse aus. Die homochiralen Vesikeln dagegen waren stabil geblieben und haben ihre eigene Bildung weiter katalysiert. Der Niederschlag des Racemates wurde weiter untersucht als möglicher Mechanismus der Erhöhung der Enantiomeren-Reinheit in den Vesikeln. Von einer nicht racemischen Mischung konnte man die Enantiomeren-Reinheit durch die Hydrolysereaktion der 2MLA in Anwesenheit der 2ML Vesikeln tatsächlich etwas erhöhen.

Als Vergleich dazu wurde ein Gelsystem aus Dibenzoyl-cystin (DBC) erforscht. Bei einer Konzentration von über 1.3 mM bildete das enantiomere DBC ein Gel, wohingegen sich das Racemat bei der gleichen Bedingung auskristallisierte. Mit dem Auskristallisieren des Racemates konnte die enantiomere Reinheit von einer nicht-racemischen Mischung bis hin zu fast 100% enantiomeren Reinheit erhöht werden.

Die Enantioselektivität wurde durch den Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeiten der zwei enantiomeren 2MLA ((RR)-2MLA und (SS)-2MLA) in Anwesenheit der homochiralen Vesikeln (entweder (R)-2ML oder (S)-2ML) untersucht. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der zwei enantiomeren Anhydride waren innerhalb der experimentellen Fehlergrenze identisch. Das zeigt, dass die Vesikeln aus einfachen Fettsäuren nicht eine starke Enantioselektivität induzieren können.

Der zweite Teil der Dissertation hat sich zum Ziel gesetzt, die funktionalen Einheiten und die "autopoietische Selbst-Reproduktion" von Fettsäurevesikeln durch die Inkorporation von Gastmolekülen zusammenzubringen. Ein relativ hydrophobes Peptid, Z-Phe-His-Leu (Z-FHL), wurde als Gastmolekül verwendet. Die Assoziationseigenschaften von Z-FHL zu Oelsäurevesikeln wurde mittels Gleichgewichtsdialyse und CD untersucht. Die Gleichgewichtsdialyse-Experimente ergaben für die Assoziationskonstante bei pH 8.5 einen Wert von 21.2 (M⁻¹). CD Spektren haben gezeigt, dass die Peptide sehr wahrscheinlich in einem relativ polaren Bereich der Doppelschichten gebunden sind.

Als ein Maß der Funktionalität des Vesikel/Peptid-Komplexes wurde seine katalytische Aktivität mit p-Nitrophenylcarboxylat untersucht.

Der Komplex hat eine grosse Beschleunigung der Hydrolyse des hydrophoben Substrats p-Nitrophenylpalmitat (PNP-C16) gezeigt. Im Gegensatz dazu war die Erhöhung der Geschwindigkeit für das hydrophile Substrat p-Nitrophenylacetat (PNP-C2) minimal. Offenbar haben die Oelsäurevesikeln als ein Gastssystem gewirkt, das hydrophobe Bindungsstellen besitzt, in welchen das Peptid und das hydrophobe Substrat konzentriert wurden (erhöhte lokale Konzentration). Diese Hypothese wurde auch gestützt durch die Abhängigkeit der von den Vesikeln katalysierten PNP-C16-Hydrolyse von der Oelsäure-Konzentration. Die Tendenz war ähnlich wie im Falle der durch Mizellen katalysierten bimolekularen Reaktionen. Auf der anderen Seite hat die Darstellung der Geschwindigkeit der von den Vesikeln katalysierten Hydrolyse-reaktion als Funktion der Substratkonzentration ein Michaelis-Menten ähnliches Sättigungsverhalten gezeigt. Obwohl der Mechanismus für dieses Sättigungsverhalten nicht klar war, wurde versucht, ein Vergleich zu ziehen zwischen dem Oelsäurevesikel/Z-FHL Komplex und jenen Enzymen, deren Aktivität durch einen Aktivator geändert werden kann.

Am Ende wurden Experimente durchgeführt, bei welchen die autokatalytische Vesikelbildung mit der Bindung der Peptidmoleküle verknüpft wurden. Die Modellreaktion war die Hydrolyse von Oelsäureanhydride in einem biphasischen System, das aus einer wässrigen Phase und einer Oelsäure-anhydrid-Phase bestand. Wenn die Reaktion in Abwesenheit des Peptides in der wässrigen Phase durchgeführt wurde, induzierte die Bildung der Oelsäurevesikeln die Erhöhung der katalytischen Aktivität in der wässrigen Phase, wie mittels der PNP-C16 Hydrolyse bewiesen wurde.

Diese Beobachtung weist darauf hin, dass Ölsäurevesikeln selbst die Eigenschaften eines Katalysators besitzen. Die katalytische Aktivität wurde bei der Vesikelbildung noch deutlicher verstärkt, als es in der wässrigen Phase das Peptid gab. Die Peptidmoleküle wurden vermutlich während des Vesikelbildungsprozesses in die Lipid-Doppelschicht eingefügt. Diese Resultate weisen darauf hin, dass "selbst-reproduzierende" Einheiten wie Vesikeln möglicherweise mit anderen Funktionen verknüpft werden können, um sich zu höherer Komplexität und Funktionalität zu entwickeln.