

**A KUTATÁSI TÉMA  
2005. ÉVI  
SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉSE**

Témavezető neve: Dr. Martinek Tamás

A téma címe: Mesterséges  $\beta$ -aminosav tartalmú önszerveződő polimerek térszerkezetének és stabilitásának vizsgálata

A kutatás időtartama: 2002. 01. 01. – 2005. 01. 01.

## **Bevezetés**

A pályázatban a következő célokat tűztük ki: (i) a *cisz*-térbeliségű aliciklusos oldalláncú  $\beta$ -aminosavak homo-oligomerjeinek lehetséges másodlagos szerkezetének meghatározását különös tekintettel a másodlagos szerkezetek sztereokémiai szabályzásának megvalósítására, (ii) a szál másodlagos szerkezetet felhasználva  $\beta$ -peptid redőzött réteg építését, (iii) az önrendeződési folyamatok oldószerfüggésének megállapítását, (iv) oldalláncban funkcionizált  $\beta$ -aminosavak beépítését és végül legfontosabbként (v)  $\beta$ -peptid harmadlagos szerkezeti elemek kontrolált kialakítását. A projektben valamennyi részfeladatnál elértük a kitűzött célokat, az eredményeket a közleményeknek megfelelő csoportosításban mutatom be.

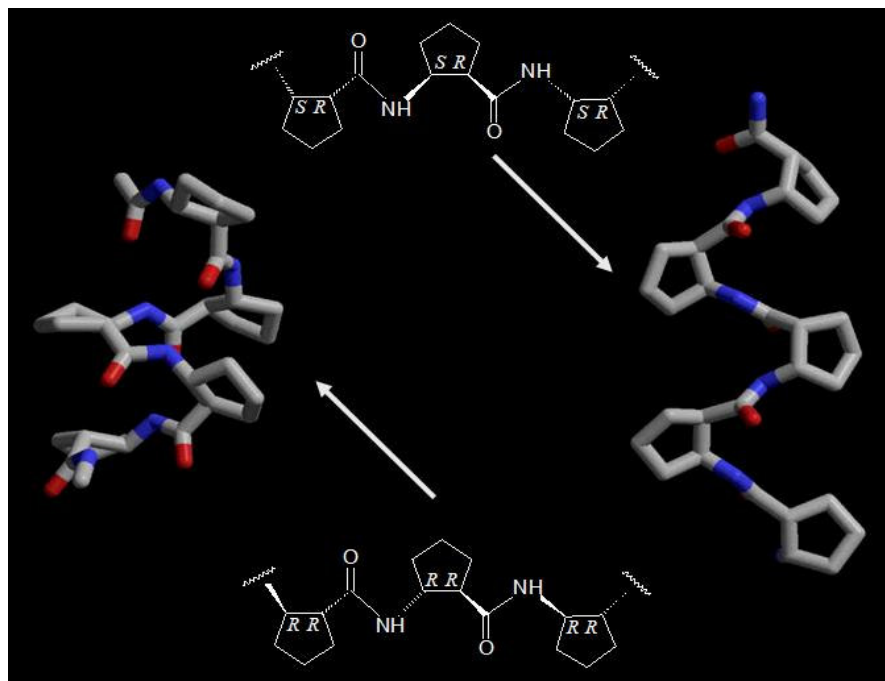
## **$\beta$ -peptid szál létrehozása sztereokémiai kontrol segítségével**

Molekulamodellezési számításokat végeztünk (*1R,2S*)-2-aminociklopentánkarbonsav (*cisz*-ACPC) oligomerjeivel, hogy megállapítsuk a preferált térszerkezet. Eredményeink szerint a *cisz*-ACPC oligomerek rendezett másodlagos szerkezet kialakítására hajlamosak. Ezen másodlagos szerkezet a C6<sup>1</sup> csoportba sorolható (Hoffman és mtsai szerint), amelyet ezidáig kísérletileg nem figyeltek meg.

Megvalósítottuk az enantiomertiszta *cisz*-ACPC valamint a trimer, pentamer, heptamer és nonamer homooligomer szintézisét. A mintákat megfelelő tisztítás után oldatfázisú NMR spektroszkópiás elemzésnek vetettük alá. A spektrumok jelhozzárendelését és a térszerkezeti adatok kinyerését akadályozták a rezonanciák átfedései. A probléma megoldásának érdekében speciális NMR pulzusszekvenciát készítettünk. Ennek segítségével teljeskörű térszerkezetvizsgálatot tudtunk végezni. A kísérleti kényszerfeltételeknek eleget tévő, alacsony energiájú konformációk megfeleltek a modellezéssel prediktált másodlagos szerkezetnek, így egészítve ki a szakirodalom által ismert  $\beta$ -peptid másodlagos szerkezetek körét. A térszerkezeteket DMSO-ban és MeOH-ban is meghatároztuk és minkét oldószernél

hasonló eredményeket kaptunk. A mintáink (különösen a lánchossz növekedésével) rossz víoldékonyságot mutattak (ld. alább).

A NMR-rel meghatározott szerkezeti adatokat IR és ECD mérések segítségével is alátámasztottuk. Az irodalomban elsőként mutattunk be szátra jellemző ECD görbét.



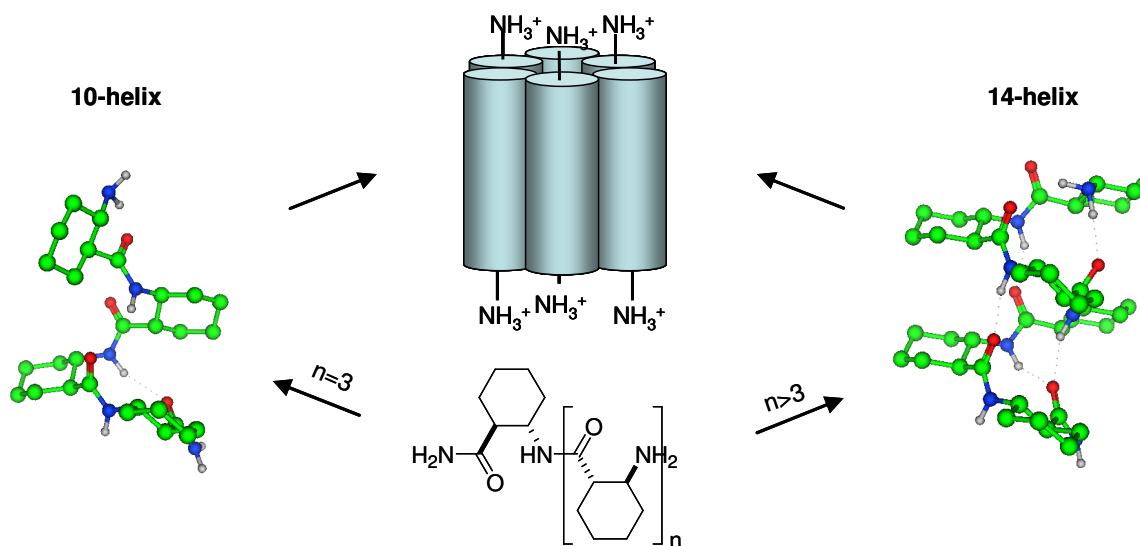
**1. ábra.** *cis*-ACPC oligomerek sztereokémiaiailag szabályozott másodlagos szerkezetei

*A kutatási eredményünk jelentősége, hogy a  $\beta$ -aminosav monomerek sztereokémiájának változtatásával szisztematikusan tudjuk szabályozni a kialakuló másodlagos szerkezetet (1. ábra). Emellett a szakirodalomban először sikerült önstabilizáló  $\beta$ -peptid szálat létrehozunk.*

## **Konformációs polimorfizmus a $\beta$ -peptid hélixeknél**

Távlati célkitűzésünk volt az önrendező harmadlagos szerkezet létrehozása. Ennek érdekében első lépésben reprodukálni kívántuk Gellman és munkatársai által megvalósított 1*S*,2*S*-2-aminociklohexánkarbonsavból (*transz*-ACHC) felépülő stabil 14-hélix előállítását. A hélixek önrendeződési folyamatával kapcsolatosan kérdéseket vet fel, hogy az irodalmi adatok szerint már négy monomeres lánchossz esetében is 14-hélix alakul ki. Egy valós rendeződés fokozottabb mértékű lánchosszfüggést feltételez. Munkánk e jelenség részletesebb vizsgálatára is koncentrált.

Megközelítésünk abban különbözött, hogy a szintézist szilárd hordozón módosított aktív észter kémiával hajtottuk végre, és a  $\beta$ -peptid oligomerek láncvégein védőcsoport nem volt. Az így előállított *transz*-ACHC tetramer, pentamer és hexamer térszerkezeteit oldatfázisban ( $d_4$ -metanol,  $d_6$ -DMSO) NMR spektroszkópiával (COSY, watergate-ROESY, TOCSY, HSQC, HMBC,  $^2\text{H}$ -csere) jellemeztük. A szerkezetvizsgálatot kiegészítettük IR és ECD mérésekkel. A *transz*-ACHC oligomerekre kapott korábbi irodalmi eredményekkel ellentétben a tetramer stabil 10-hélixet alakított ki, míg a pentamer és a hexamer a várakozásoknak megfelelően 14-hélixet. A tapasztalt láncosszfűgés alámásztja a valós önrendeződési folyamatot. A jelenség magyarázatára *ab initio* kvantumkémiai számításokat is végeztünk B3LYP/6-311G\*\*//HF/3-21G szinten. A láncosszfűgő stabilitási trendet a számolt konformációs energiák visszaadták, és a jelenséget a lokális diéderes szög preferenciák és a távolható hidrogén kötések közötti egyensúllyal tudtuk magyarázni.



## 2. ábra. *transz*-ACHC oligomerek konformációs polimorfizmusa és önrendeződése

Ezek a megfigyelések egyrészt bizonyítják, hogy az oldalláncban konformációsán gátolt  $\beta$ -peptidek valódi önrendeződési folyamatban veszik fel végső, legstabilabb másodlagos szerkezetüket (2. ábra). Másrészt ily módon analógia figyelhető meg az  $\alpha$ -peptidek  $\alpha$ -hélixének nukleációja kapcsán, mivel ennek kialakulását rövidebb láncosszak esetén a nyújtottabb  $3_{10}$ -hélix előzi meg és ezáltal nukleálja az  $\alpha$ -hélix képződését. A  $\beta$ -peptidek esetében a nukleáló faktorként a 10-hélix azonosítható be.

## Szabályozott önrendeződés és harmadlagos szerkezeti elemek a $\beta$ -peptideknél

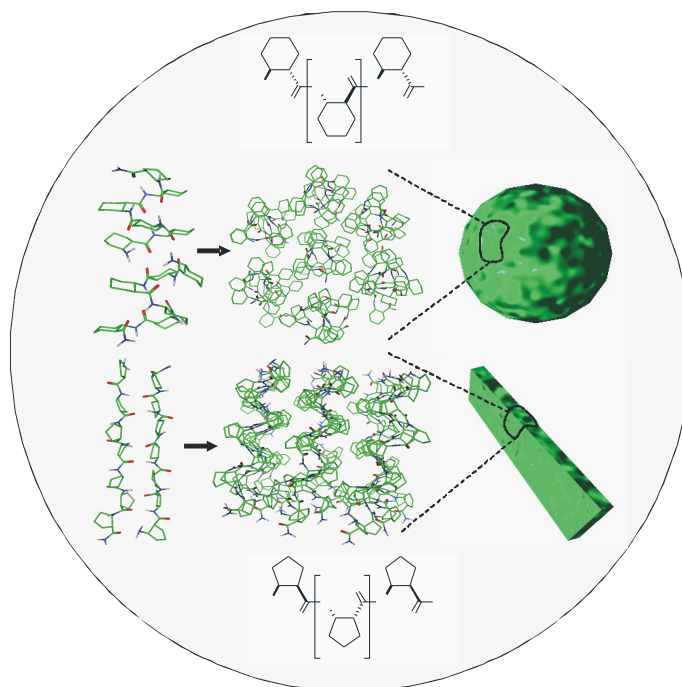
A projekt fő célkitűzése a  $\beta$ -peptid harmadlagos szerkezeti motívumok létrehozási lehetőségeinek vizsgálata. A modellként vizsgált *transz*-ACHC és *cisz*-ACPC oligomerek amfipatikus molekuláknak foghatók fel, mely felveti magasabb szintű szerveződés lehetőségét.

Előzetes méréseink kimutatták, hogy a helikális *transz*-ACHC oligomer esetén az amid protonok lecserélődési sebessége töredéke a várt értéknek. Ez arra mutatott, hogy a hélixet stabilizáló H-kötések jelentős mértékben árnyékolva vannak az oldószertől, amelynek okát az hélixek aggregációjában kereshetjük. Megvizsgáltuk a *cisz*-ACPC  $\beta$ -peptid szál specifikus asszociációra hajlamát is, és a NH/ND cseresebesség jelentős lánchossz és koncentráció-függést mutatott.

Továbbiakban a másodlagos szerkezeti egységek asszociációját diffúziós NMR, dinamikus fényszórás (DLS) és transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) segítségével jellemeztük. Az asszociációt magyarázó modellt elméleti számításokkal támasztottuk alá.

Diffúziós NMR mérésekkel az asszociáció jelenségét igazoltuk mindkét típusú másodlagos szerkezet esetén. Nagyobb méretű részecskéket és időfüggő viselkedést tapasztaltunk a DLS mérések kapcsán is. Az asszociátumok TEM-mel történő morfológiai vizsgálata azt mutatta, hogy hélix-egységek hélixköteg membránt alkotnak, ami vezikula jellegű szférikus objektumként stabilizálódik. A  $\beta$ -peptid szálak fibrilláris morfológiát mutattak, amelyek a redőzött rétegek szendvicseként jöhettek létre. A megfigyelések nanostrukturált részecskék jelenlétét igazolták. Az elméleti számítások (*ab initio*, molekuladinamika) alátámasztották a morfológiából kikövetkeztetett szerkezeti tulajdonságokat.

*A másodlagos szerkezetfüggő önrendeződést oldatfázisban először figyeltük meg. A nanostrukturált részecskéket a harmadlagos szerkezetre jellemző erők tartják össze (3. ábra), így ezek az eredmények igazolják a  $\beta$ -peptidek képességét a magasabb szintű önszerveződésre. A megállapított törvényszerűségek hozzájárulhatnak a jövő  $\beta$ -peptid harmadlagos szerkezeinek ( $\beta$ -protein?) tervezéséhez.*



**3. ábra.** Másodlagos szerkezetfüggő önrendeződés harmadlagos szerkezeti motívumokba

## Összefoglalás

A projekt eredményeinek segítségével választ kaphattunk a  $\beta$ -peptidek másodlagos szerkezeteinek sztereokémiai szabályzásával, konformációs polimorfizmusával és a kontrolált önrendeződésével kapcsolatos legfontosabb kérdésekre. A megfigyelések hozzájárulhatnak a  $\beta$ -peptid alapvázal rendelkező bioaktív molekulák tervezéséhez és bio-nanotechnológiai alkalmazások is elképzelhetők. Eredményeinket három eredeti közleményben publikáltuk, amiket igen rangos nemzetközi folyóiratokban tettük közzé. Visszatekintve a  $\beta$ -peptidek térszerkezetével kapcsolatos irodalmi adatokra valamint felhasználva a saját eredményeinket a projekt ideje alatt két összefoglaló tanulmányt készítettünk.