

PEPTIDEK, PEPTIDMIMETIKUMOK ÉS MÁS KIRÁLIS SZERVES VEGYÜLETEK TÉRSZERKEZET-VIZSGÁLATA VCD- SPEKTROSKÓPIÁVAL

ZÁRÓJELENTÉS

Bevezetés

A kutatás fő célkitűzése a Magyarországon elsőként az ELTE Kémiai Intézetének Kiroptikai Szerkezetvizsgáló Laboratóriumában bevezetett VCD-spektroszkópia meghonosítása volt a peptidek és peptidszármazékok térszerkezetének vizsgálatában, valamint alternatívát kínálni a röntgendiffrakciós módszerrel szemben a folyékony vagy nem kristályosítható királis szerves vegyületek abszolút konfigurációjának meghatározására. A projekt keretében királis szerves molekulák széles körének vizsgálatát terveztük annak érdekében, hogy feltárjuk a VCD-spektroszkópia kínálta előnyök mellett a módszer hátrányait és alkalmazhatóságának korlátait is.

A kisméretű peptideken és peptidmimetikumokon végzett vizsgálatok egyik célja a különböző kanyarszerkezetek (elsősorban C_7 H-kötéses γ -kanyarok és C_6 vagy C_8 H-kötéses pszeudo- γ -kanyarok) VCD-spektroszkópai azonosítása, valamint az oldószer- és konformációs hatások szétválaszthatóságának tesztelése volt.

A projekt keretében nem kizárólag VCD-spektroszkópai mérésekre került sor, hanem esetenként kombinált FTIR- és CD-spektroszkópai vizsgálatokat is végeztünk a konkrét probléma legcélszerűbb megoldása érdekében. A spektrumok értelmezése – amennyiben a molekula mérete lehetővé tette – kvantumkémiai számítások alapján történt.

Eltérések az eredeti munkatervtől

A kutatás fő vonalait tekintve az eredeti munkatervet követte, voltak azonban eltérések. Ez leginkább abból adódott, hogy a projekt nagyban támaszkodott együttműködések keretében előállított modellvegyületekre és nem tartalmazott kimondott preparatív kémiai részt. A vizsgálandó vegyületek egy része a vártnál később állt rendelkezésre, vagy pedig a tervezettől eltérő szerkezetű volt. Így nem került például sor királis bifenilszármazékok vizsgálatára. A kutatás során bevezetett új mátrixizolációs VCD-technika (a későbbiekben erre még részletesebben kitérek) és új típusú modellvegyületek vizsgálata miatt szükségessé vált a kutatási terv részleges módosítása illetve 1 éves meghosszabbítása.

•

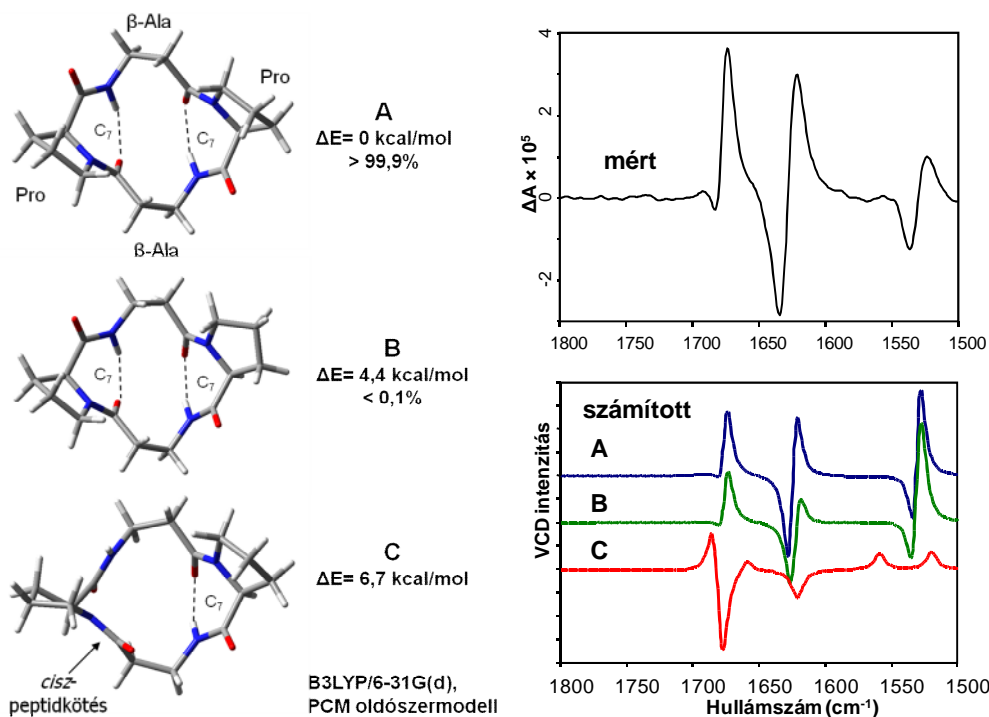
A legfontosabb kutatási eredmények összefoglalása

β -Aminosavakat tartalmazó ciklopeptidek VCD-spektroszkópiai vizsgálata

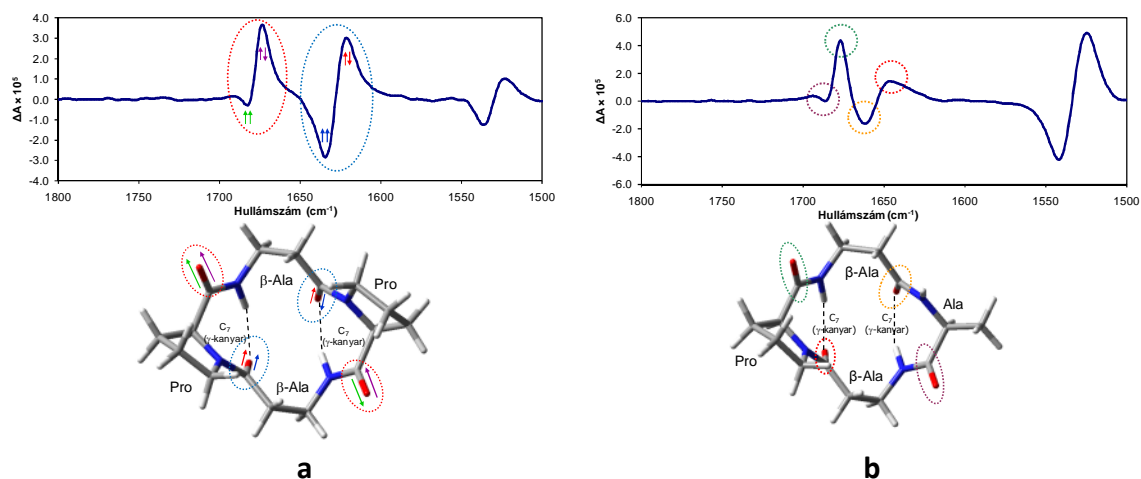
A kutatás egyik kiemelt témaköre a β -aminosavakat és β -homo-aminosavakat tartalmazó kisméretű ciklopeptidek VCD-spektroszkópián alapuló térszerkezet-vizsgálata volt. E peptidmimetikumok közül a γ -kanyar-modellvegyületeknek szánt, 2 db. β -alanin egységet tartalmazó ciklo(β -Ala-Xxx- β -Ala-Yyy) (Xxx, Yyy = Ala, Pro) típusú ciklotetrapeptidek részletes konformációvizsgálatára, valamint a rezgési spektrumok oldószerfüggésének tanulmányozására tettük a hangsúlyt.

A ciklo(β -Ala-Pro- β -Ala-Pro) és ciklo(β -Ala-Ala- β -Ala-Pro) modellvegyületek esetében megállapítottuk, hogy a vizsgált oldószerekben (acetonitril- d_3 , diklórmétán, trifluor-etanol- d_2) gyakorlatilag egyetlen konformer formájában vannak jelen, melyben két inverz γ -kanyar található. A ciklo(β -Ala-Pro- β -Ala-Pro) esetében a két Pro aminosavrészlet, a ciklo(β -Ala-Ala- β -Ala-Pro) esetében az Ala és Pro körül alakulnak ki a γ -kanyarok. A szerkezetek stabilitására utalt a hidrogénkötések megmaradása dimetil-szulfoxidban is. Az infravörös spektrumban trifluor-etanolban észlelt nagyobb sáveltolódásokról megállapítottuk, hogy nem konformáció-változásra, hanem oldószerhatásra vezethetők vissza, ugyanis a konformációra jóval érzékenyebb VCD-spektrumok sávmintázata lényegében nem változott. E két vegyület esetében a trideutero-acetonitril bizonyult a legmegfelelőbb oldószernek a VCD-spektroszkópiai vizsgálatokhoz, így az egyes konformerek geometriájának optimalizálása és elméleti VCD-spektrumának kiszámítása során acetonitrilre kidolgozott polarizálható kontinuum oldószermodellt alkalmaztunk a Gaussian03 programcsomag segítségével. Mindkét esetben összesen 8-10 konformer B3LYP/6-31G* elméleti szintű geometria-optimalizálását, majd ezt követően VCD-spektrumának kiszámítását végeztük el. A konformerek relatív energiáján alapuló populációanalízis kizárta több konformer egyidejű jelenlétét. A VCD-spektroszkópia és kvantumkémiai módszerek kombinálásán alapuló konformációanalízis lényegét a ciklo(β -Ala-Pro- β -Ala-Pro) peptid esetében az **1. ábra** szemlélteti a három legkisebb energiájú (A-C) konformerrel. A két legalacsonyabb energiájú konformer (A és B) egyaránt 2-2 C_7 H-kötéses inverz γ -kanyar-szerkezetet tartalmaz a Pro egységek körül, eltérő azonban a β -Ala aminosavegységük gerinckonformációja, így míg az A konformer C_2 szimmetriájú, a B konformer aszimmetrikus. Nem meglepő, hogy számított VCD-spektrumaik igen hasonlóak és rendkívül jó egyezést adnak a mért spektrummal, a B konformer számított populációja azonban elhanyagolható. A C konformer már csak egyetlen γ -kanyart tartalmaz, mivel az egyik β -Ala-Pro kötése *cisz* konfigurációjú. Ez utóbbi konformer kizárható mind a mért spektrumtól igen eltérő elméleti spektruma, mind pedig igen nagy relatív energiája alapján. A rezgési sávok értelmezéséhez figyelembe kell venni, hogy a nagyfokú szimmetria miatt erős az amidcsoportok rezgéseinek csatolása, ami a VCD-spektrumban jellegzetes sávpárokhoz (couplet) vezet. Az alacsonyabb hullámszámú (1625 cm^{-1} körüli) pozitív couplet a γ -kanyarban részvevő, H-kötés-akceptor karbonilok, a nagyobb

hullámszámú (1625 cm^{-1} körüli) aszimmetrikus pozitív couplet a szabad karbonilok antiszimmetrikus ill. szimmetrikus csatolt rezgéséből származik (**2a ábra**).



1. ábra. A ciklo(β-Ala-Pro-β-Ala-Pro) peptid legkisebb energiájú (A-C) konformerei, valamint acetonitril-d₃ oldószerben mért és az A-C konformerek számított VCD-spektruma az amid I-II tartományban



2. ábra. A ciklo(β-Ala-Pro-β-Ala-Pro) (a) és ciklo(β-Ala-Ala-β-Ala-Pro) (b) amid I VCD-sávjainak értelmezése az egyes amidcsoportok karbonilrezgése alapján (a hozzárendelést színek kódok szemléltetik)

A ciklo(β-Ala-Ala-β-Ala-Pro) VCD-spektruma (ld. **2b ábra**) hasonlít az előző peptidére. Mivel e ciklopeptid nem szimmetrikus szerkezetű, az egyes amidcsoportok rezgése között nincs csatolás, így a VCD-sávok egyértelműen hozzárendelhetők az egyes amidcsoportokhoz.

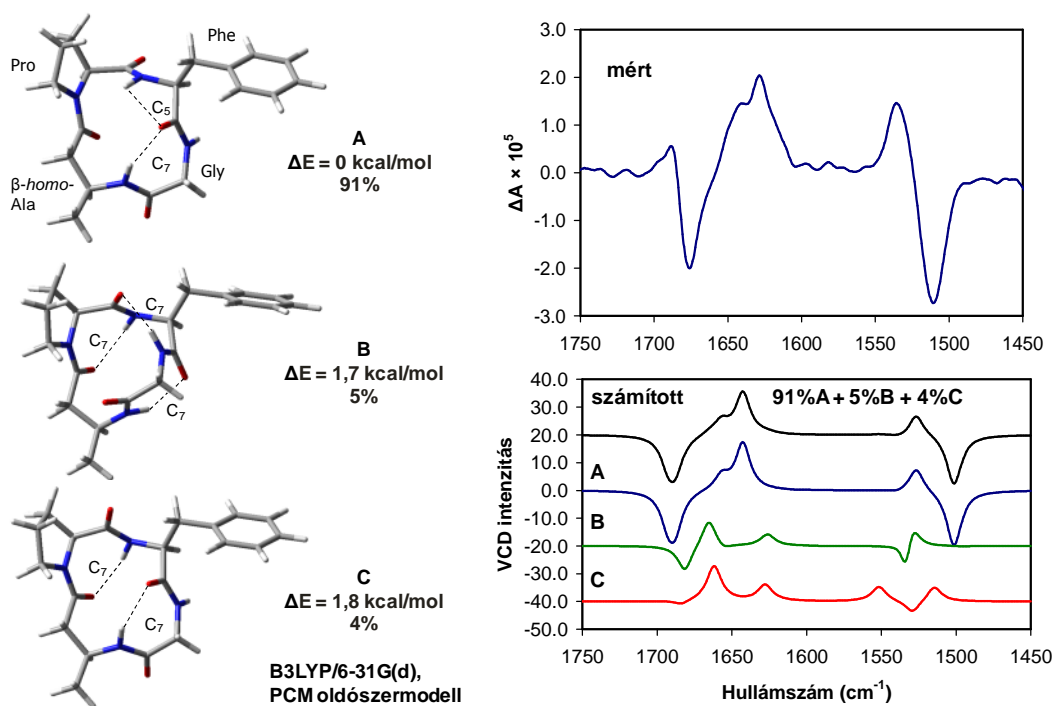
A legalacsonyabb hullámszámú, széles pozitív amid I sáv a Pro körüli, az 1660 cm^{-1} körüli negatív sáv pedig az Ala körüli γ -kanyar H-kötés-akceptor karboniljától származik. A magasabb hullámszámú sávok itt is a szabad karbonilokhoz rendelhetők.

Az előbbiekkal analóg ciklo(β -Ala-Ala- β -Ala-Ala) problémásabb modellvegyületnek bizonyult, ugyanis a legtöbb VCD-spektroszkópiában használatos szerves oldószerben igen rosszul oldódott, vagy pedig rövid időn belül aggregált. A vegyület rossz oldékonysága számos szerves oldószerben illetve igen jó vízoldhatósága már a szintézise és HPLC-s tisztítása során is gondot okozott. A VCD-spektrum még a peptideket általában jól oldó dimetil-szulfoxidban is rendkívül erős koncentrációfüggést mutatott, a 4-10 mg/ml koncentrációtartományban előjelet váltott és nagyobb koncentrációnál rendkívül intenzívvé vált, ami erős aggregációs hajlamra utal. Nagyobb koncentrációnál ($> 6\text{ mg/ml}$) a molekulák DMSO- d_6 -ban valószínűleg szendvicsszerű intermolekuláris asszociátumokat képeznek, melyek spektruma már nem értelmezhető az önálló molekula egyes konformereinek számított spektruma alapján. Értékelhető VCD-spektrumot csak híg ($< 4\text{ mg/ml}$) DMSO- d_6 oldatban illetve a vegyületet jól oldó, ám drága és viszonylag szűk spektrumtartományban használható dideutero-trifluoretanolban (TFE- d_2) sikerült felvenni (10 mg/ml koncentrációt alkalmazva). A híg DMSO- d_6 -ban és TFE- d_2 -ben kapott VCD-görbék hasonló lefutásúak, így azonos térszerkezetre utalnak. A konformációanalízis és spektrumszámítás során trifluor-etanolra kidolgozott oldószermodellt alkalmaztunk. A spektrum alapján a vegyület térszerkezete trifluor-etanolban megfelel a legkisebb energiájú, C_2 szimmetriával rendelkező, viszonylag nyújtott konformerével, melyben a két alaninrészlet körül inverz γ -kanyar található, és ez teljesen analóg a ciklo(β -Ala-Pro- β -Ala-Pro) és (β -Ala-Ala- β -Ala-Pro) szerkezetével. A VCD-spektrum hasonlít a ciklo(β -Ala-Ala- β -Ala-Pro) peptidére, azzal a különbséggel, hogy a Pro egység hiánya miatt nem jelentkezik $1650\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ között a széles pozitív sáv. Érdeemes megjegyezni, hogy a TFE oldószermodellel kapott legkisebb energiájú konformer vákuumban végzett geometria-optimalizálás során instabil, és tulajdonképpen egy hasonló, de sokkal kompaktabb szerkezetbe megy át, melynek számított spektruma már nem írja le jól a mért spektrumot. Ez a tapasztalat a konformációanalízis és a VCD-spektrumok számítása során alkalmazott oldószermodell fontosságát hangsúlyozza.

Mindhárom előbb tárgyalt vegyület esetében sor került az ECD spektrumok felvételére is, és a VCD-spektroszkópia alapján valószínűsített geometriát nemrég sikerült alátámasztani az ECD spektrumok TD-DFT módszeren alapuló kvantumkémiai számításával. Ezt azért tartjuk rendkívül fontosnak, mert a VCD technika kis érzékenysége miatt 1-2 nagyságrenddel töményebb oldatot igényel, így kizárhattuk a térszerkezet nagy koncentráció miatti lényeges módosulását illetve az esetleges aggregáció miatti artifaktumokat. Az eredményeket publikálása folyamatban van, részleges közlésükre poszter formájában a 28. Európai Peptidszimpoziumon került sor.¹

¹ Vass E; Kóhalmi K; Hollósi M; Majer Zs: *Spectroscopic investigations on model cyclic peptides containing beta-amino acids*, pp. 1037-1038, Peptides 2004, Proceedings of the Third International and Twenty-Eighth European Peptide Symposium, September 5-10, 2004, Prague, 2005.

Több olyan ciklotrapeptid VCD-spektroszkópai vizsgálatát is végeztük, amely nem 2, hanem csak 1 darab β -aminosav egységet tartalmazott, és ahol a ciklo(Ala-Pro-Phe-Gly) szekvenciában az egyes α -aminosavakat rendre a homológ β -aminosavra cseréltük ki. E vegyületek általában rosszul oldódtak kevésbé poláros oldószerekben, de DMSO- d_6 -ban sikerült felvenni a VCD-spektrumukat, így a konformációanalízis és spektrumszámítás során DMSO oldószermódellet alkalmaztunk. Azt tapasztaltuk, hogy a β -homoaminosavegység jelenléte a szomszédos α -aminosavegységek körül γ -kanyart (C_7) indukált, de a várttal ellentétben nem jöttek létre C_6 , C_8 H-kötéses ún. pseudo- γ -kanyar szerkezetek a β -aminosavegységek körül, ami arra utal, hogy a kisméretű, feszült rendszerekben a C_7 kedvezőbb. A számítások szerint több esetben már a kisebb energiájú konformerekben is kialakulhat *cisz*-peptidkötés és több esetben konformerelegy volt valószínűsíthető. A sorozatból minden kétséget kizáróan a ciklo(β -homoAla-Pro-Phe-Gly) térszerkezetét sikerült megoldani és a mért VCD-spektrumot a **3. ábrán** látható A-C konformerek spektrumának populációval súlyozott összegeként értelmezni. A spektrumban a legkisebb energiájú A konformer hozzájárulása dominál, ebben a Gly aminosavegység körül jött létre egy klasszikus γ -kanyar, melyet egy további, a Phe aminosavegységen belüli C_5 H-kötés stabilizál (bifurkált H-kötéses séma jön létre). Az eredményt a 28. Európai Peptidszimpóziumon poszteren mutattuk be.¹



3. ábra. A ciklo(β -homoAla-Pro-Phe-Gly) peptid legkisebb energiájú (A-C) konformerei, valamint DMSO- d_6 oldószemben mért és az A-C konformerek számított VCD-spektruma

A Bielefeldi Egyetem Szerves és Bioorganikus Kémiai Tanszékével folytatott együttműködés keretében az előbbiekkal analóg, nagyobb méretű (öt- és hattagú) ciklopeptidok kombinált spektroszkópai vizsgálatát is végeztük (CD, FTIR, NMR), melyek egy részében a Pro egységet β -homoPro egységre cseréltük: ciklo(Ala-Val-Pro-Phe-Gly),

ciklo(Ala-Val- β -homoPro-Phe-Gly), ciklo(Leu-Ala-Val-Pro-PheI-Gly), ciklo(Leu-Ala-Val- β -homoPro-Phe-Gly). Míg a Pro egységet tartalmazó ciklopeptidek esetében II típusú β -kanyar és inverz γ -kanyar jelenlétét sikerült kimutatni, addig a β -homoPro egységet tartalmazó homológoknál a CD spektrumban 205 nm-nél jelentkező domináns negatív sávot pszeudo- β - vagy pszeudo- γ -kanyarhoz rendeltük, melyet FTIR- és NMR-spektroszkópiával is igazoltunk. A ciklo(Ala-Val- β -homoPro-Phe-Gly) peptideben a C₈ H-kötéssel stabilizált pszeudo- γ -kanyar a β -homoPro egység körül alakult ki, ugyanakkor a β -homoPro egy C₁₁ H-kötéses pszeudo- β -kanyar kialakításában is részt vesz, így végeredményben egy bifurkált H-kötéses rendszer jön létre.² A ciklo(Ala-Val- β -homoPro-Phe-Gly) és ciklo(Leu-Ala-Val- β -homoPro-Phe-Gly) esetében megvizsgáltuk a Ca²⁺-ionok kötését IR- és VCD-spektroszkópiával, megállapítva, hogy 1:1 sztöchiometriájú komplexek képződnek.

β -Aminosav-egységekből felépülő lineáris oligopeptidek vizsgálata

A β -aminosav egységeket tartalmazó modellpeptidek vizsgálata során figyelmünk később egyre inkább a kizárólag β -aminosavakból felépülő ún. β -peptidekre irányult, melyek VCD-spektroszkópiaili jellemzése korábban feltáratlan terület volt. E témában a *cisz*- β -aminociklopentánkarbonsav (*cisz*-ACPC) alternáló kiralitású enantiomerjeiből felépített H-[(1*S*,2*R*)-*cisz*-ACPC-(1*R*,2*S*)-*cisz*-ACPC]_n-NH₂ (n=2, 3) típusú heterokirális oligomerek vizsgálatát végeztük Fülöp Ferenc (Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerkémiai Intézete) csoportjával való együttműködés keretében. Diklórometán és DMSO-*d*₆ oldószerben végzett VCD-spektroszkópiaili mérésekkel és kvantumkémiai számításokkal egyértelműen igazoltuk, hogy az ilyen típusú alternáló oligomerek igen stabilis jobbmenetes H10/H12-hélixet képeznek. Ezt a speciális hélixet váltakozó C₁₀ és C₁₂ intramolekuláris H-kötések stabilizálják, mely még a közismerten H-kötéseket felszakító dimetil-szulfoxid oldószerben is nagyrészt megmarad. Az alternáló kiralitású homo-oligomerek térszerkezete teljesen eltér a korábban FTIR-, CD-, és NMR-spektroszkópiával vizsgált H-[(1*R*,2*S*)-*cisz*-ACPC]_n-NH₂ típusú homo-oligomerekétől, melyek esetében C₆ intramolekuláris H-kötésekkel stabilizált ún. Z6-szál másodlagos szerkezet alakul ki. Az eredmények közzlésére a Gdańsk-ban 2006. szeptember 3-8 között megrendezett 29. Európai Peptidkémiai Szimpóziumon (poszter), valamint a J. Am. Chem. Soc. folyóiratban cikk formájában került sor.³

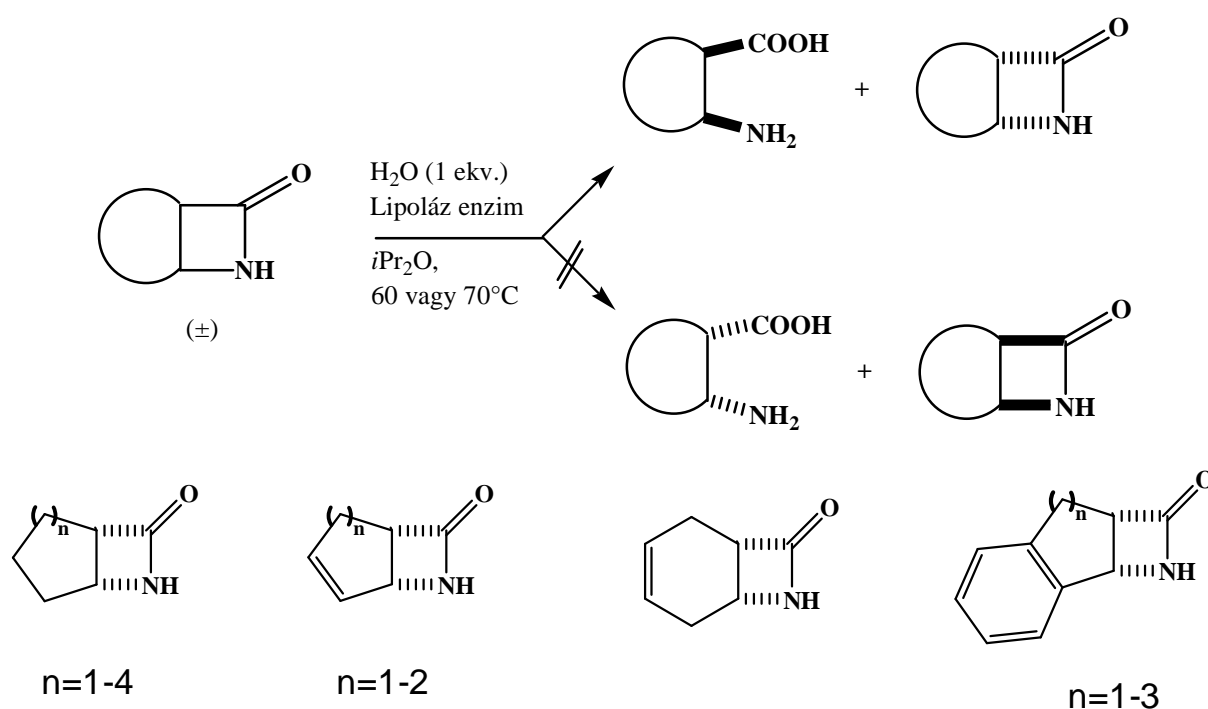
Királis β -laktámok VCD-spektroszkópiaili vizsgálata

A Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerkémiai Intézetével folytatott együttműködés keretében racém gyűrűs β -laktámokból kiinduló, lipolázzal katalizált enantioszelektív

² Malešević M; Majer Zs; Vass E; Huber T; Strijowski U; Hollósi M; Sewald N: ***Spectroscopic Detection of Pseudo-Turns in Homodetic Cyclic Penta- and Hexapeptides Comprising β -Homoproline***, Int. J. Pept. Res. Ther., 12, 165-177, 2006

³ Martinek TA; Mándity IM; Fülöp L; Tóth GK; Vass E; Hollósi M; Forró E; Fülöp F: ***Effects of the Alternating Backbone Configuration on the Secondary Structure and Self-Assembly of β -Peptides***, J. Am. Chem. Soc., 128, 13539-13544, 2006

enzimatiskus hidrolízis során nyert királis gyűrűs β -laktámok abszolút konfigurációjának meghatározását végeztük el (**1. séma**). Az abszolút konfiguráció meghatározása mellett a VCD-spektroszkópia és molekulamodellzés lehetővé tette a különböző gyűrűtagszámú, esetenként kettőskötést tartalmazó, vagy aromás gyűrűvel kondenzált aliciklusos β -laktámok (összesen 10 vegyület) konformációs viszonyainak feltárását, valamint több esetben hidrogénkötéses ciklusos dimer szerkezetek azonosítását is. Egyértelműen igazolható volt, hogy az enzim jelenlétében mindig ugyanolyan abszolút konfigurációjú termék keletkezett, függetlenül a kondenzált gyűrű méretétől, annak telített, telítetlen vagy aromás jellegétől. Az eredmények részletes ismertetése egy a *Chirality* folyóiratban 2006-ban közölt cikkben található meg.⁴



1. Séma. A vizsgált, lipoláz-reakcióval előállított királis β -laktámok szerkezete

Ugyancsak β -laktám típusú vegyületek VCD-spektroszkópiai vizsgálatát végeztük a Lengyel Tudományos Akadémia Szerves Kémiai Intézetével folytatott együttműködés keretében. Ebben az esetben a β -laktám gyűrű kefalosporin típusú antibiotikum-intermedierek szerkezeti elemeként volt jelen, és a vizsgálat célja a β -laktám gyűrűhöz kapcsolódó oldalláncok vagy gyűrű konformációjának meghatározása volt. Az eredmények arra utaltak, hogy a vizsgált laktámok kloroformos oldatban konformer-elegyként vannak jelen, többnyire domináns konformer nélkül.

⁴ Vass E; Hollósi M; Forró E; Fülöp F: *VCD spectroscopic investigation of enantiopure cyclic β -lactams obtained through Lipolase-catalyzed enantioselective ring-opening reaction*, *Chirality*, 18, 733-740, 2006

α -Laktalbumin Ca-kötő helyét modellező ciklopeptidek rezgési és kiroptikai spektroszkópai vizsgálata

Kombinált FTIR- és CD-spektroszkópai módszerrel vizsgáltuk az α -laktalbumin Ca^{2+} -kötő helyét modellező több ciklopeptid Ca^{2+} -ionok hatására bekövetkező térszerkezet-változását, melynek alapján sikerült tisztázni a kalciumkötő helyen található aszparaginsav-oldalláncok szerepét a kalciumion komplexálásában, valamint a karboxilátion és a Ca^{2+} különböző komplexálási sémáit (mono-, bidentát, H-kötéses áthidalt szerkezetek). E vegyületek esetében nem lehetett VCD-spektroszkópai mérést alkalmazni, mivel az ehhez a szükséges nagy koncentrációban a vizsgált peptidok Ca^{2+} -ionok hatására azonnal kicsapódtak volna. Az e témakörben született eredményeket a *Bioorganic and Medicinal Chemistry* c. folyóiratban publikáltuk.⁵

Az SV40 sejtmag-lokalizációs szignálpeptid oligodezoxinukleotidokhoz való kötődésének FTIR-spektroszkópai vizsgálata

Az SZBK Biofizikai Intézetével és a párizsi Gustave Roussy Intézettel folytatott együttműködés keretében a Pro-Lys-Ser-Lys-Arg-Lys-Val-Ser szekvenciájú SV40 sejtmag-lokalizációs szignálpeptid, valamint N-oktil- (Oct-SV40) és N-palmitoil (Pal-SV40) származékának egy 18-tagú oligo-dezoxiribonukleotiddal (ODN) való kötődését vizsgáltuk ATR-FTIR-spektroszkópai módszerrel, vizes puffer oldatban. A biológiai szempontból is releváns vizsgálati körülmények (vizes puffer, az agregáció csökkentését célzó viszonylag alacsony koncentráció) miatt VCD-mérés technikailag nem volt lehetséges. Az FTIR-vizsgálatok alapján a peptid-ODN komplex elsősorban a peptid pozitív töltésű aminocsoportjai és az oligonukleotid negatív töltésű foszfátcsoportjai közti erős elektrosztatikus kölcsönhatásnak tulajdonítható. A Pal-SV40 származék erősebb kötődést mutatott, mint az SV40 vagy az Oct-SV40 származék, mely összhangban van a biológiai vizsgálatok során tapasztalt sejtmembrán-transzlokációs aktivitással. Az eredményekből az Arch. Biochem. Biophys. folyóiratban jelent meg publikáció.⁶

Tengeri ingola GNR-III peptidek FTIR- és VCD-spektroszkópai vizsgálata

Az ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoporttal együttműködve egy daganatellenes hatású peptid, a tengeri ingola GNR-III (Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂; IGnRH-III), valamint lizin oldalláncon keresztül cisztinnel vagy N-acetil-cisztinnel kialakított diszulfid-hidas dimer származékainak $\{[IGnRH-III(H-Cys)]_2$ ill. $IGnRH-III(Ac-Cys)]_2\}$ térszerkezetét

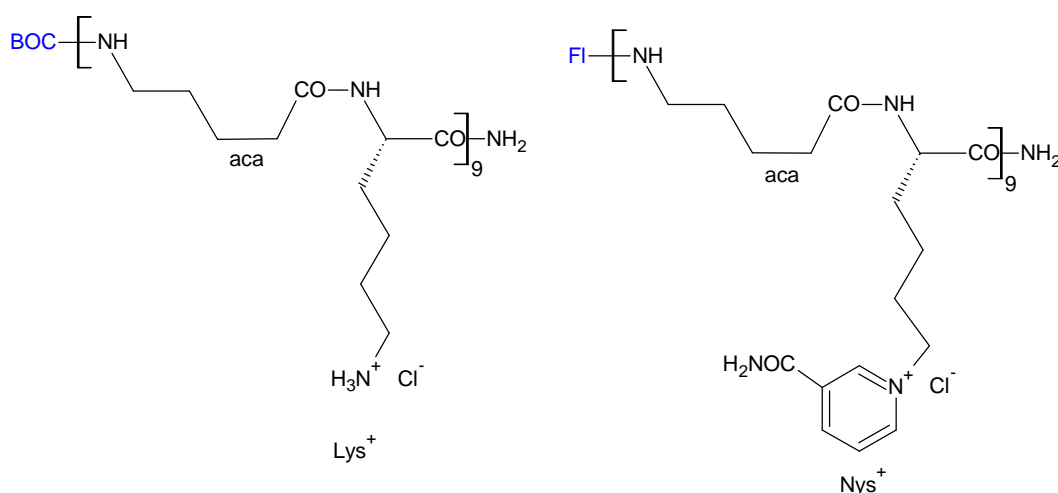
⁵ Farkas V; Vass E; Hanssens I; Majer Zs; Hollósi M: ***Cyclic peptide models of the Ca^{2+} -binding loop of α -lactalbumin***, Bioorgan. Med. Chem., 13, 5310-5320, 2005

⁶ Laczkó I; Váró Gy; Bottka S; Bálint Z; Illyés E; Vass E; Bertrand J-R; Malvy C; Hollósi M: ***N-terminal acylation of the SV40 nuclear localization signal peptide enhances its oligonucleotide binding and membrane translocation efficiencies***, Arch. Biochem. Biophys., 454, 146-154, 2006

vizsgáltuk FTIR- és VCD-spektroszkópiával. A három vegyület DMSO- d_6 oldószerben mért FTIR-spektruma hasonló volt, 1668 cm^{-1} körüli széles amid I sávval, melyhez a VCD-spektrumban negatív couplet tartozott. Ez arra utal, hogy a vizsgált peptidek zömében rendezetlen szerkezetűek, ugyanakkor az IGnRH-III monomer és az [IGnRH-III(Ac-Cys)]₂ dimer bizonyos fokig β -agregátumok képzésére is hajlamos, mely e vegyületek VCD-spektrumában 1611 cm^{-1} ill. 1617 cm^{-1} körül kis negatív sávként volt tapasztalható. Az eredményekből a Peptides folyóiratban publikáció született.⁷

Aca-Lys és aca-Nys⁺ részletekből felépülő sejtpenetrációs oligopeptidek FTIR- és CD-spektroszkópiai vizsgálata

A Floridai (Gainesville) és a Miami-i Egyetemekkel, valamint az IVAX Gyógyszerkutató Intézettel (Budapest) együttműködve arginiben gazdag penetrációs peptidek újonnan szintetizált lizin és trigonellin oldalláncú [Lys(Nys⁺) vagy egyszerűen Nys⁺] analógjainak térszerkezetét vizsgáltuk FTIR- és CD-spektroszkópiával. A vizsgált oligopeptidek szekvenciája alternáló ϵ -aminokapronsav (aca) és Lys⁺ vagy Nys⁺ egységekből épült fel, az N-terminálison BOC védőcsoportot tartalmazó illetve fluoreszcein-jelölést (FI) tartalmaztak (**2. séma**).



2. Séma

E vegyületek daganatellenes szerek célbajuttatásához hordozómolekulákként játszhatnak szerepet. A Nys⁺ tartalmú peptid humán karcinoma (HeLa) sejtekben fokozott mértékű felvételt mutatott, mely összhangban állt a spektroszkópiai és molekuladinamikai adatok alapján valószínűsíthető, lépegető hernyóra emlékeztető, nyújtott szerkezettel.⁸

⁷ Mező G; Czajlik A; Manea M; Jakab A; Farkas V; Majer Zs; Vass E; Bodor A; Kapuvári B; Boldizsár M; Vincze B; Csuka O; Kovács M; Przybylski M; Perczel A; Hudecz F: **Structure, enzymatic stability and antitumor activity of sea lamprey GnRH-III and its dimer derivatives**, Peptides, 28, 806-820, 2007.

⁸ Bodor N; Tóth-Sarudy É; Holm T; Pallagi I; Vass E; Buchwald P; Langel U: **Novel, cell-penetrating molecular transporters with flexible backbones and permanently charged side-chains**, J. Pharm. Pharmacol, 59, 1065-1076, 2007.

β-Amiloid aggregációjának vizsgálata kisméretű, potenciálisan fibrillogenezis-gátló peptidek jelenlétében

Az SZBK Biofizikai Intézetével együttműködve kombinált CD- és FTIR-spektroszkópai vizsgálatok az Alzheimer-kor kialakulásáért felelős Aβ(1-42) amiloid peptid LPFFD-OH és LPYFD-NH₂ szekvenciájú lineáris pentaptidek jelenlétében illetve hiányában bekövetkező aggregációját, a pentapeptidek esetleges fibrillogenezis-gátló, β-redőzött réteg romboló tulajdonságának kimutatására. A vizsgálatokat nem lehetett VCD-spektroszkópai mérésekkel kivitelezni, mert a β-amiloid nagy koncentráció mellett azonnal irreverzibilisen aggregál, kicsapódik az oldatból. A spektrumok időbeni változását 1 hétig követve megállapítottuk, hogy a LPFFD-OH nem akadályozta a β-fibrillumok kialakulását (sőt enyhén elősegítette az aggregációt), ezzel szemben az LPYFD-NH₂ peptid bizonyos mértékű aggregációt késleltető hatást mutatott. A két peptid eltérő viselkedése feltehetően a konformációs sajátosságaiknak tulajdonítható: az LPFFD-OH részben nyújtott, részben β-kanyar szerkezetű, az LPYFD-NH₂ viszont túlnyomórészt β-kanyar konformációjú. Az eredményeket összefoglaló cikk megjelenése folyamatban van.⁹

Kisméretű királis molekulák és védett aminosav-származékok mátrixizolációs VCD-spektroszkópai vizsgálata

Az ELTE Kiroptikai Szerkezetvizsgáló Laboratóriuma által üzemeltetett VCD-spektrométerrel és a Molekulaspektroszkópai Laboratórium munkatársai (Tarczay György, Magyarfalvi Gábor) által kifejlesztett mátrixizolációs berendezéssel végzett kísérletek összekapcsolása egy igen gyümölcsöző együttműködést eredményezett, létrehozva a világon első rendszeresen működő mátrixizolációs VCD-spektroszkópai laboratóriumot (mintegy két évtizeddel ezelőtt az irodalomban már közöltek mátrixizolációs VCD-spektrumot, azonban a technikai nehézségek miatt a kísérleteket abbahagyták). A mátrixizolációs technika előnye, hogy a nagy feleslegben alkalmazott nemesgáz (Ar, Kr) áramban a vizsgálandó molekulákat 8-12 K hőmérsékleten, nagy vákuumban szilárd nemesgáz mátrix formájában kifagyasztjuk egy infravörös sugárzást áteresztő (CsI vagy BaF₂) kristályra, így mintegy kölcsönhatásmentes környezetet hozva létre. Az alacsony hőmérséklet sokkal jobb felbontást, a spektrális sávok jó elkülönülését eredményezi, továbbá az izolált (mátrixba zárt) molekulák spektruma sokkal jobb egyezést ad a számított spektrummal, mint amit oldatfázisú kísérletek során kapnánk.

Az alacsony hőmérsékletű mátrixizolációs VCD-spektroszkópiával (MI-VCD) elsőként sikerült egy bonyolult konformációs egyensúlyban levő és hidrogénkötéses asszociációkra

⁹ Laczkó I; Vass E; Soós K; Fülöp L; Zarándi M; Penke B: ***Aggregation of Aβ(1-42) in the presence of short peptides: conformational studies***, J. Peptide Sci. 64, DOI: 10.1002/psc.990, 2008.

hajlamos királis molekula, az *R*-2-amino-1-propanol VCD-spektrumát a legfontosabb konformerek egyedi spektrális hozzájárulásának súlyozott összegeként értelmezni.¹⁰

Az MI-VCD technika – a nagy felbontás, a konformációs egyensúly befagyasztása és az intermolekuláris kölcsönhatások minimalizálása miatt – ígéretesnek tűnt védett aminosavszármazékok, dipeptidek térszerkezet-vizsgálatában, így például az Ac-Ala-NHMe, Ac-Pro-NH₂ (és mátrixizolációs infravörös spektroszkópiával az akirális Ac-Gly-NHMe) típusú diamidok konformereinek tanulmányozására. Az MI-VCD-spektrumban az Ac-Ala-NHMe esetében a nyújtott, C₅ H-kötéses $\beta_{L(D)}$ és a C₇ H-kötéses γ -kanyart tartalmazó γ_L konformert egyértelműen sikerült azonosítani, míg oldatban (diklórmetán, DMSO-d₆) ezek VCD-sávjai nem váltak szét (az Ac-Gly-NHMe esetében egy nyitott szerkezetű harmadik konformer, a $\delta_{L=D}$ is valószínűsíthető volt a mátrixizolációs FTIR-spektrum alapján).¹¹ Az oldószeres VCD-spektrumokban az amid II tartományban pozitív-negatív sávpár jelentkezett, mely nem egyezett a konformerek számított spektrumával (csak pozitív amid II sávokat vártunk), viszont mátrixizolációs körülmények között ez az anomália nem jelentkezett, így az eltérést az oldószerrel való kölcsönhatással lehet magyarázni. Az Ac-Pro-NH₂ esetében egy domináns konformert, a C₇ H-kötéses γ -kanyart tartalmazó γ_L -t (a *t* jelölés a *transz* Ac-Pro amidkötésre utal), valamint nyomokban a H-kötést nem tartalmazó *cisz* Ac-Pro amidkötéses α_L -t lehetett kimutatni.¹²

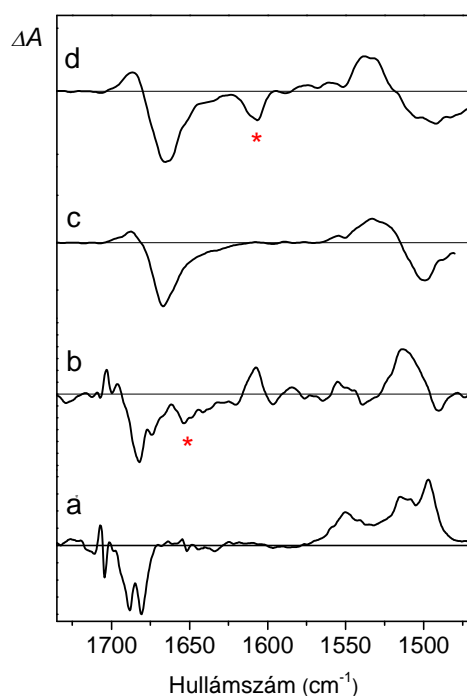
A témakörben a legfrissebb eredmények az Ac-Ala-NHMe vízzel történő komplexképzésének oldatfázisú és MI-VCD-spektroszkópiai vizsgálatából születtek.¹³ Kimutattuk, hogy a víz és a diamid modellvegyület közt létrejövő H-kötéses komplexekben az önmagában akirális vízmolekula királissá válik, így deformációs rezgése negatív sávként megjelenik mind a vízzel telített diklórmetán-oldatban, mind pedig a vizes Ar-mátrixban nyert VCD-spektrumban (**4. ábra**). A jelenség kiralitástranzferként ismert, létrejötté egyértelműen bizonyítja a komplexképzést. A számított és a mért MI-VCD spektrumok összehasonlítása alapján megállapítottuk, hogy elsősorban az Ac-Ala-NHMe $\beta_{L(D)}$ konformere vesz részt a komplexálásban, a vízmolekulát mind a C- mind pedig az N-terminális amidcsoport kötheti.

¹⁰ Tarczay Gy; Magyarfalvi G; Vass E: **Towards Absolute Configuration Determination of Complex Molecular Systems: Matrix Isolation Vibration Circular Dichroism Study of *R*-2-amino-1-propanol**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 1775-1777, 2006.

¹¹ Pohl G; Perczel A; Vass E; Magyarfalvi G; Tarczay Gy: **A matrix isolation study on Ac-Gly-NHMe and Ac-L-Ala-NHMe, the simplest chiral and achiral building blocks of peptides and proteins**, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9, 4698-4708, 2007.

¹² Pohl G; Perczel A; Vass E; Magyarfalvi G; Tarczay Gy: **A matrix isolation study on Ac-L-Pro-NH₂ : a frequent structural element of β - and γ -turns of peptides and proteins**, *Tetrahedron* 64, 2126-2133, 2008.

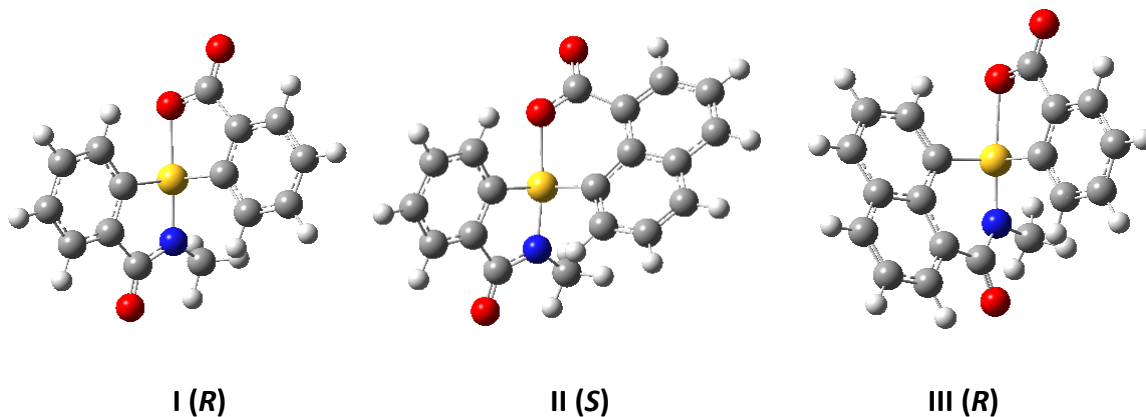
¹³ Tarczay Gy; Góbi S; Vass E; Magyarfalvi G: **Model Peptide - Water Complexes in Ar Matrix: Complexation Induced Conformation Change and Chirality Transfer**, *Vibrational Spectroscopy*, 2008, közlésre beküldve.



4. ábra. Az Ac-Ala-NHMe VCD-spektruma Ar-mátrixban (a), vizes Ar-mátrixban (b), száraz diklórmetánban (c) és vízzel telített diklórmetánban (d). A komplexált víz kiralitászferből eredő VCD-sávját * jelöli.

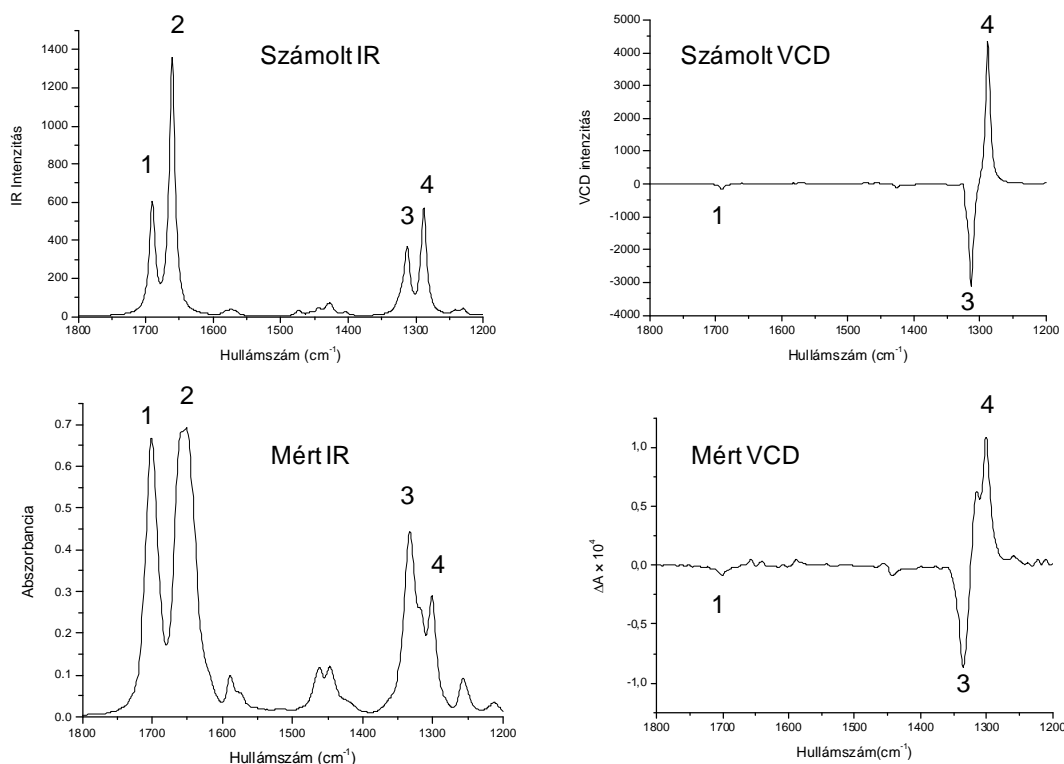
Spiro- λ^4 -szulfánok VCD-spektroszkópiai vizsgálata

A kutatási tervnek megfelelően speciális, pseudo-trigonális-bipiramis szerkezetű, a hipervalens kénvegyületek kategóriájába tartozó spiro- λ^4 -szulfánok VCD-spektroszkópiai vizsgálatát is végeztük. E vegyületekben a spirociklusba zárt kénatom képezi a kiralitáscentrumot. A méréseket a **3. sémán** feltüntetett, N-S(IV)-O axiális kötésrendszerű diaril(acilamino)(aciloxi)spiro- λ^4 -szulfánok balra forgató enantiomerjein végeztük, melyek aszimmetrikus axiális kötésrendszere nagymértékben polarizálható, így e vegyületek átmenetet képeznek a klasszikus λ^4 -szulfán és az ikerionos szulfónium-karboxilát szerkezet között. Ez a fokozott polarizálhatóság az infravörös spektrumban jól nyomon követhető volt: már a két ötagú gyűrűs I vegyület aciloxi-karboniljának $\nu\text{C=O}$ rezgési frekvenciája is (1653 cm^{-1}) alacsonyabb volt az azonos gyűrűtagszámú laktonénál (tehát részben karboxilát jellegű volt), és még tovább csökkent az eltérő gyűrűméretű II és III szulfán esetében (1638 cm^{-1} ill. 1645 cm^{-1}). Az utóbbi esetben jelentős mértékű rezgési csatolás volt megfigyelhető az aciloxi- és karbamoilrészlet két karbonilja között. Az I szulfán acetonnitrilben agregált, ezért vizsgálatát DMSO- d_6 oldószerben végeztük, a másik két vegyület IR- és VCD-spektrumát acetonnitril- d_3 oldószerben vettük fel.



3. séma. A vizsgált N-S(IV)-O axiális kötésrendszerű spiro- λ^4 -szulfánok szerkezete

Az axiális kötésrendszer erős polarizálhatóság miatt a kvantumkémiai számításokat vákuumban (B3LYP/6-31G*, B3LYP/6-311G** és B3LYP/6-311++G** szinten) és PCM oldószermodell alkalmazásával (B3LYP/6-31G* szinten) is elvégeztük, a legjobb egyezést a kísérleti adatokkal egyértelműen az oldószermodellel végzett számítások adták. Az infravörös spektrumokban általában a két karbonilcsoport (részben átfedő) sávja dominált, az ujjlenyomat-tartományban csak kis- vagy közepes intenzitású sávok jelentek. A VCD-spektrumban fordított helyzet állt elő, az ujjlenyomat-tartományban nagy, a karbonil tartományban kicsi volt a VCD sávok intenzitása, elsősorban a két öttagú gyűrűs I vegyület esetében (**5. ábra**).



5. ábra. Az I spiro- λ^4 -szulfán mért és számított IR- és VCD-spektruma

Az abszolút konfiguráció meghatározására az 1300 cm^{-1} körüli tartományban jelentkező $\nu_{\text{as}}\text{C-CO-N}$ (3) és $\nu_{\text{as}}\text{C-CO-O}$ (4) rezgések intenzív sávjai voltak legalkalmasabbak (**5. ábra**), melyek a szomszédos aromás gyűrűk hidrogénjeinek síkban deformációs rezgéseivel is csatolást mutattak. A mért és számított VCD-spektrumok összehasonlítása révén egyértelműen megállapítottuk, hogy a vizsgált szulfánok balra forgató enantiomerjeinek abszolút konfigurációja az **I** és **III** szerkezet esetében *R*, a **II** szerkezet esetében *S* volt, azaz megfeleltek a **3. sémán** bemutatottaknak. Valójában mindhárom vegyület azonos kiralitású, az eltérő jelölés csupán a Cahn-Ingold-Prelog konvencióból ered.

Következtetések

A vizsgált királis vegyületek sokfélesége alapján az alábbi általános következtetéseket vonhatjuk le:

A VCD-spektroszkópia a legtöbb esetben hatékony módszernek bizonyult királis molekulák abszolút konfigurációjának vagy oldatban kialakuló konformációjának meghatározásában, de nem alkalmazható rutinszerűen minden esetben.

A többféle ciklusos és lineáris modellpeptid és peptidmimetikum VCD-spektroszkópiai vizsgálata egyértelművé tette, hogy nem lehet általános empirikus szabályokat alkotni a VCD-spektrum alapján való térszerkezet-becslésre, minden szerkezet egyedi esetként kezelendő és a spektrum értelmezéséhez konformációanalízis és kvantumkémiai számítás szükséges. Kivételt képeznek a nagyobb méretű, periodikus másodlagos szerkezeti elemeket tartalmazó peptidok és fehérjék, melyek esetében a VCD-spektrum sávmintázata alapján globális térszerkezeti információhoz juthatunk.

A VCD-spektroszkópia alkalmazását több esetben nehezítette (vagy egyes esetekben megakadályozta) a minta rossz oldhatósága, az agregáció ugyanis értékelhetetlen spektrumokat eredményez. Ilyen problémás esetekben a térszerkezeti információhoz kisebb koncentrációjú mintákat igénylő technikák kombinálásával (pl. CD és FTIR) jutottunk.

Nehézséget okozhat a molekula túlzott konformációs mozgékonyága, ugyanis közepes vagy nagyobb méretű molekuláknál az összes lehetséges konformer figyelembe vétele és spektrumának megfelelő kvantumkémiai szintű számítása igen nagy számítógépkapacitást igényel, a spektrum kiértékelése még így is bizonytalan lehet a konformerek becsült populációjának pontatlansága miatt.

Az oldószer erős kölcsönhatása a molekulával megnehezítheti a spektrum értelmezését, e probléma kiküszöbölésére a mátrixizolációs VCD-technika (MI-VCD) nyújthat megoldást, mely egyidejűleg nagyobb spektrális felbontást is eredményez, így több konformer detektálását teszi lehetővé. Az általunk már sikeresen bevezetett MI-VCD technika jelenleg kisméretű, viszonylag illékony mintákra korlátozott, de a közeljövőben együttműködés keretében egy olyan berendezés kifejlesztését tervezzük, mely lehetővé teszi az elektropray elve alapján nagyobb méretű molekulák nemesgáz-mátrixba juttatását.