

PEPTID FOLDAMEREK: SZERKEZET ÉS ALKALMAZÁS

MARTINEK TAMÁS

Bevezetés és célkitűzések

A foldamer fogalom a biomolekulák szerkezeti tulajdonságainak általánosítása. Azokat a mesterséges láncmolekulákat nevezzük foldamereknek, amelyek képesek programozható önrendeződésre és ezáltal szabályos, jól definiált térszerkezetek létrehozására. Ezek a korábban nem létező szekvenciák ugyanazoknak a szabályoknak engedelmeskedve képesek önrendeződésre, mint a proteinek vagy a nukleinsavak, de ez nem jelenti azt, hogy az önrendeződés hajtóereje és útja pontosan ugyanolyan beállításokat nyer. A különböző kölcsönhatások aránya szabályozható az építőelemek jellemzőivel, és ez az a pont ahol a kémiai diverzitás kiteljesedhet, és a biomolekuláknál megszokott komplexitás megjelenhet. Legfőbb célunk az volt, hogy bővítsük ismereteinket az alifás foldamerek feltekeredésének szabályairól és a tervezési alapelvekről. Az elmúlt évtizedben számos egyértelmű bizonyíték látott napvilágot arra vonatkozóan, hogy a biomolekulák mellett a foldamereknek is lehet hierarchikus, önrendeződő és programozható felépítésük. Másokkal együtt saját munkánk is hozzájárult ahhoz, hogy lehetővé vált az alifás foldamerek térszerkezeti elemeinek racionális, esetenként *de novo* tervezése. Az eredményeink négy főbb téma köré csoportosíthatók: (i) foldamerek szerkezetének sztereokémiai szabályozása, (ii) oldalláncok alakjának és térkitöltésének hatása a másodlagos szerkezetre, (iii) láncosz- függési vizsgálatok és konformációs polimorfia valamint (iv) foldamer építőelemekből konstruált nanostrukturált rendszerek.

Módszerek

A foldamer láncokat szilárd hordozós peptidszintézissel állítottuk elő Fmoc vagy Boc kémia alkalmazásával. A hordozó, az aktiválószer és a többi kísérleti paraméter vonatkozásában tekintettel kellett lennünk a térgátolt hidrofób β -aminosavak esetenként megváltozott reakciókészségére. A HPLC-vel tisztított vegyületeket a részletes vizsgálatok előtt HPLC-MS módszerrel jellemeztük. A NMR spektroszkópiás vizsgálatokat 2D homonukleáris módszerek felhasználásával végeztük különböző oldószerekben (CD_3OD , CD_3OH , $\text{DMSO}-d_6$ és víz) széles koncentráció tartományban. Az amid protonok árnyékoltsága, a csatolási állandók, elektronikus és vibrációs cirkuláris dikroizmus és elméleti számítások segítségével győződünk meg, hogy van-e jellemző, rendezett konformáció. A szerkezetfinomítási számításokat a ROESY spektrumokból meghatározott távolsági kényszerfeltételekkel végeztük molekuláris erőtermodell alkalmazásával, majd a szerkezeteket *ab initio* kvantumkémiai szinten is optimalizáltuk. Az önasszociációt mutató rendszereknél diffúziós NMR, transzmissziós elektronmikroszkópia, dinamikus fényszórás és esetenként koncentráció-függő ECD segítségével végeztünk vizsgálatokat.

5. Haznagy-Radnai, E.; Rethy, B.; Czige, S.; Zupko, I.; Weber, E.; **Martinek, T.**; Falkay, G.; Mathe, I., Cytotoxic activities of Stachys species. *Fitoterapia* **2008**, *79*, 595-597.
6. Haznagy-Radnai, E.; Pintye-Hodi, K.; Czige, S.; **Martinek, T.**; Janicsak, G.; Mathe, I.; Eros, I., Chromatographic determination of iridoids in Stachys recta, and investigation of inorganic elements by X-ray fluorescence spectroscopy. *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc* **2008**, *21*, 27-32.
7. **Martinek, T. A.**; Varga, T.; Fulop, F.; Bartok, M., NMR spectroscopic and theoretical evidence of cinchona alkaloid-ketopantolactone complex formation in aprotic solvents: Implications for the mechanism of Pt-catalyzed enantioselective hydrogenation of activated ketones. *Journal of Catalysis* **2007**, *246*, 266-276.
8. Hajdu, Z.; Hohmann, J.; Forgo, P.; Martinek, T.; Dervarics, M.; Zupko, I.; Falkay, G.; Cossuta, D.; Mathe, I., Diterpenoids and flavonoids from the fruits of Vitex agnus-castus and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents. *Phytotherapy Research* **2007**, *21*, 391-394.
9. Balazsik, K.; **Martinek, T. A.**; Bucsi, I.; Szolli, G.; Fogassy, G.; Bartok, M.; Olah, G. A., A new rigid cinchona modified (α -IQ) platinum catalyst for the enantioselective hydrogenation of activated ketones: Data to the origin of enantioselection. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* **2007**, *272*, 265-274.
10. Jojart, B.; **Martinek, T. A.**; Marki, A., The 3D structure of the binding pocket of the human oxytocin receptor for benzoxazine antagonists, determined by molecular docking, scoring functions and 3D-QSAR methods. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2005**, *19*, 341-356.
11. Almeida, D. R. P.; Gasparro, D. M.; **Martinek, T. A.**; Fulop, F.; Csizmadia, I. G., Resolution of carvedilol's conformational surface via gas and solvent phase density functional theory optimizations and NMR spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A* **2004**, *108*, 7719-7729.
12. Zalan, Z.; **Martinek, T. A.**; Lazar, L.; Fulop, F., Synthesis and conformational analysis of 1,3,2-diazaphosphorino[6,1-a]isoquinolines, a new ring system. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9117-9125.

20. Szatmari, I.; **Martinek, T. A.**; Lazar, L.; Fulop, F., Substituent effects in the ring-chain tautomerism of 1,3-diaryl-2,3-dihydro-1H-naphth[1,2-c] [1,3]oxazines. *Tetrahedron* **2003**, 59, 2877-2884.
21. Szakonyi, Z.; Balazs, A.; **Martinek, T. A.**; Fulop, F., Stereoselective synthesis of pinane-based beta- and gamma-amino acids via conjugate addition of lithium amides and nitromethane. *Tetrahedron-Asymmetry* **2010**, 21, 2498-2504.
22. Benedek, G.; Palko, M.; Weber, E.; **Martinek, T. A.**; Forro, E.; Fulop, F., Efficient synthesis of 3,4- and 4,5-dihydroxy-2-amino-cyclohexanecarboxylic acid enantiomers. *Tetrahedron-Asymmetry* **2009**, 20, 2220-2225.
23. Szakonyi, Z.; **Martinek, T. A.**; Sillanpaa, R.; Fulop, F., Regio- and stereoselective synthesis of constrained enantiomeric beta-amino acid derivatives. *Tetrahedron-Asymmetry* **2008**, 19, 2296-2303.
24. Szakonyi, Z.; **Martinek, T. A.**; Sillanpaa, R.; Fulop, F., Regio- and stereoselective synthesis of the enantiomers of monoterpene-based beta-amino acid derivatives. *Tetrahedron-Asymmetry* **2007**, 18, 2442-2447.
25. Szakonyi, Z.; Balazs, A.; **Martinek, T. A.**; Fulop, F., Enantioselective addition of diethylzinc to aldehydes catalyzed by gamma-amino alcohols derived from (+)- and (-)-alpha-pinene. *Tetrahedron-Asymmetry* **2006**, 17, 199-204.

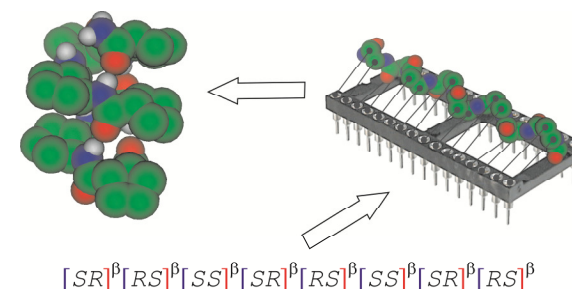
Egyéb közlemények:

1. Majzik, A.; Fulop, L.; Csapo, E.; Bogar, F.; **Martinek, T.**; Penke, B.; Biro, G.; Dekany, I., Functionalization of gold nanoparticles with amino acid, beta-amyloid peptides and fragment. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2010**, 81, 235-241.
2. Mandity, I. M.; **Martinek, T. A.**; Darvas, F.; Fulop, F., A simple, efficient, and selective deuteration via a flow chemistry approach. *Tetrahedron Letters* **2009**, 50, 4372-4374.
3. Kolozsi, A.; Vosekalna, I.; **Martinek, T.**; Larsen, E.; Gyurcsik, B., Copper(II) and zinc(II) ion binding properties of a MAP type branched ligand with histidines as surface functionalities. *Dalton Transactions* **2009**, 5647-5654.
4. **Martinek, T. A.**; Varga, T.; Balazsik, K.; Szollosi, G.; Fulop, F.; Bartok, M., Enantioselective hydrogenation of ketopantolactone using Pt-beta-ICN chiral catalyst: Correlation between the solution-state concentration of a nucleophilic beta-isocinchonine-ketopantolactone complex and enantioselectivity. *Journal of Catalysis* **2008**, 255, 296-303.

Új tudományos eredmények

1. Foldamerek térszerkezetének sztereokémiai szabályzása

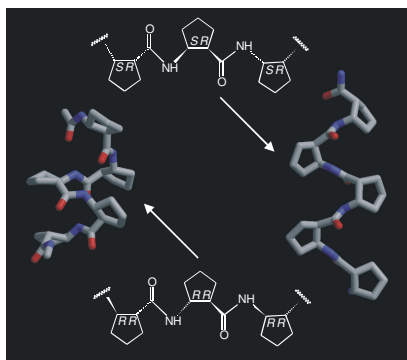
1.1 A természetes α -aminosavakból felépülő proteinek/peptidek és a mesterséges peptid foldamerek másodlagos szerkezeteinek átfogó vizsgálatával felismertük [1-3], hogy a gerinc szénatomok térkémiája és a hozzájuk kapcsolódó Ramachandran-Balaram torziós szögek között általánosítható összefüggés áll fenn. Felfigyeltünk a φ, ψ torziós szögek előjelének mintázata és a másodlagos szerkezet közötti kapcsolatra is. Így a következő szabályokat állapítottuk meg: (i) hélix esetén az egyes peptid-kötéseket határoló sztereocentrumoknak azonos térbeliségűeknek kell lenniük, és a sztereokémiai mintázatnak ismétlődőnek kell lennie a hélix periodicitásának megfelelően; (ii) szálak esetén az egyes peptid-kötéseket határoló sztereocentrumoknak ellentétesnek kell lennie. Alátámasztottuk, hogy a biológiai rendszerekben ismert homokiralitás nem feltétele periodikus másodlagos szerkezetek kialakulásának, és meghatároztuk, hogy ez a kötöttség meddig lazítható. Az összefüggések egy jól használható eszközt adnak a térkémi másodlagos szerkezetre gyakorolt hatásának megértéséhez és alkalmazásához. A mintázati megközelítés rámutatott arra is, hogy a torziók előjele illetve az ezt befolyásoló abszolút konfigurációk egyfajta bináris kódot alkotnak, amelyek a másodlagos szerkezet alaptípusát és több tulajdonságát képesek meghatározni (1. ábra).



1. ábra.

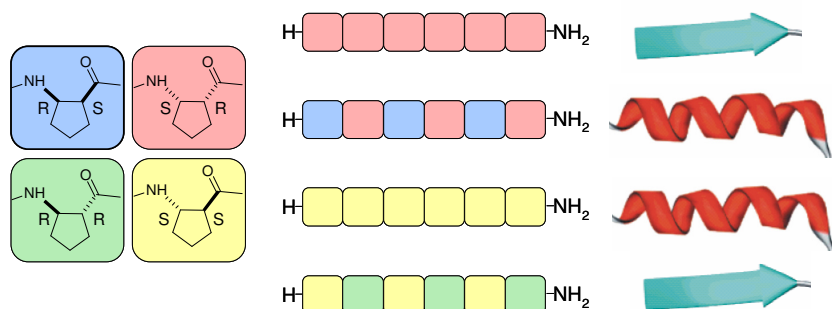
Ebben az összefüggésben ezt egy szoftvernek foghatjuk fel, ami a peptidláncon mint hardveren „végrehajtottva” a másodlagos szerkezetet adja kimenetként. A szabályok prediktíveknek bizonyultak, segítségükkel több új másodlagos szerkezetet terveztünk és igazoltunk kísérletesen. Jelenleg az irodalomban 24 α -, β - és γ -aminosavat tartalmazó foldamer periodikus másodlagos szerkezet ismert. Ebből 7 struktúrát (5 hélix- és 2 szál-típust) mi írtunk le először.

1.2 Felismertük, hogy cikloalifás oldalláncok esetén a helikális másodlagos szerkezet szál-típusú konformációba kapcsolható, ha a homokirális *trans*-2-aminociklopentánkarbonsav egységeket *cis*-2-aminociklopentánkarbonsav monomerekre cseréljük (2. ábra) [4]. Nagyfelbontású NMR spektroszkópiás és más



2. ábra

kiegészítő (IR, CD) szerkezetvizsgálati módszerekkel kimutattuk, hogy az említett elemekből építkezve a H12 hélix nempoláris Z6 szállá alakítható, amely redőzött réteg létrehozására alkalmas. A területen addig kialakult vélekedéstől eltérően az általunk előállított szerkezet hajtó-típusú stabilizáló elem nélkül, önmagában is stabilis volt. Ezzel az eredménnyel az első között mutattunk rá, hogy a β -peptid foldamerek körében a szerkezet sztereokémiai eszközökkel rendkívül hatékonyan szabályozható.



3. ábra

1.3 A sztereokémiai mintázat variálását kiterjesztettük dipeptid egységekre és *ab initio* kvantumkémiai modellezéssel alternáló kiralitású β -peptid oligomereket modelleztünk, majd a prediktált szerkezeteket kísérletesen ellenőriztük. NMR spektroszkópiás és egyéb kiegészítő módszereket (IR, CD, VCD) alkalmazva megállapítottuk, hogy az alternáló *cis*-2-aminociklopentánkarbonsav szekvenciák (H-[(1*S*,2*R*)-ACPC-(1*R*,2*S*)-ACPC]_n-NH₂) igen stabilis H10/12 típusú alternáló hélixet alakítanak ki. Ez a szerkezet a hasonló irodalmi modellektől eltérően részben vízben is megtartotta szerkezetét [5].

9. Szatmari, I.; **Martinek, T. A.**; Lazar, L.; Fulop, F., Synthesis of 2,4-diaryl-3,4-dihydro-2H-naphth[2,1-e][1,3]oxazines and study of the effects of the substituents on their ring-chain tautomerism. *European Journal of Organic Chemistry* **2004**, 2231-2238.

10. Dervarics, M.; Otvos, F.; **Martinek, T. A.**, Development of a chirality-sensitive flexibility descriptor for 3+3D-QSAR. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2006**, 46, 1431-1438.

11. Jojart, B.; **Martinek, T. A.**, Performance of the general amber force field in modeling aqueous POPC membrane bilayers. *Journal of Computational Chemistry* **2007**, 28, 2051-2058.

12. Toth, G.; Ioja, E.; Tomboly, C.; Ballet, S.; Tourwe, D.; Peter, A.; **Martinek, T.**; Chung, N. N.; Schiller, P. W.; Benyhe, S.; Borsodi, A., beta-methyl substitution of cyclohexylalanine in Dmt-Tic-Cha-Phe peptides results in highly potent delta opioid antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 50, 328-333.

13. **Martinek, T. A.**; Otvos, F.; Dervarics, M.; Toth, G.; Fulop, F., Ligand-based prediction of active conformation by 3D-QSAR flexibility descriptors and their application in 3+3D-QSAR models. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, 3239-3250.

14. Szatmari, I.; **Martinek, T. A.**; Lazar, L.; Koch, A.; Kleinpeter, E.; Neuvonen, K.; Fulop, F., Stereoelectronic effects in ring-chain tautomerism of 1,3-diarylnaphth[1,2-e][1,3]oxazines and 3-alkyl-1-arylnaphth[1,2-e][1,3]oxazines. *Journal of Organic Chemistry* **2004**, 69, 3645-3653.

15. Hetenyi, A. N.; **Martinek, T. A.**; Lazar, L.; Zalan, Z.; Fulop, F., Substituent-dependent negative hyperconjugation in 2-aryl-1,3-N,N-heterocycles. Fine-tuned anomeric effect? *Journal of Organic Chemistry* **2003**, 68, 5705-5712.

16. Lazar, L.; Goblyos, A.; **Martinek, T. A.**; Fulop, F., Ring-chain tautomerism of 2-aryl-substituted *cis*- and *trans*-decahydroquinazolines. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 4734-4741.

17. Solymar, M.; Palko, M.; Martinek, T.; Fulop, F., Synthesis of imidazo[1',5':1,2]pyrido[3,4-b]indole derivatives. *Monatshefte Fur Chemie* **2002**, 133, 1423-1430.

18. Kiss, L.; Forro, E.; **Martinek, T. A.**; Bernath, G.; De Kimpe, N.; Fulop, F., Stereoselective synthesis of hydroxylated beta-aminocyclohexanecarboxylic acids. *Tetrahedron* **2008**, 64, 5036-5043.

19. Zalan, Z.; **Martinek, T. A.**; Lazar, L.; Sillanpaa, R.; Fulop, F., Synthesis and conformational analysis of tetrahydroisoquinoline and piperidine-fused 1,3,4,2-oxadiazaphosphinanes, new ring systems. *Tetrahedron* **2006**, 62, 2883-2891.

12. **Martinek, T. A.**; Hetenyi, A.; Fulop, L.; Mandity, I. M.; Toth, G. K.; Dekany, I.; Fulop, F., Secondary structure dependent self-assembly of beta-peptides into nanosized fibrils and membranes. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 2396-2400.

13. Fulop, F.; **Martinek, T. A.**; Toth, G. K., Application of alicyclic beta-amino acids in peptide chemistry. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35*, 323-334.

14. Martinek, T. Távol a homokiralitástól, avagy a peptidomimetikumok önrendeződése. *Magyar Tudomány* **2009**, *170*, 782-788.

Az értekezés témájába közvetlenül nem tartozó, de a vizsgálat tárgyát vagy módszereit tekintve kapcsolódó közlemények:

1. **Martinek, T. A.**; Szolnoki, E.; Zalan, Z.; Fulop, F., Synthesis and steric structure of pyrrolidine- and piperidine-fused 1,3,4,2-oxadiazaphosphinanes. *Arkivoc* **2007**, 202-209.

2. Csomos, P.; **Martinek, T. A.**; Lazar, L.; Fulop, F., Synthesis and stereochemistry of azeto[2,1-a]isoquinolin-2-one derivatives. *Arkivoc* **2003**, 87-93.

3. Weber, E.; Hetenyi, A.; Vaczi, B.; Szolnoki, E.; Fajka-Boja, R.; Tubak, V.; Monostori, E.; **Martinek, T. A.**, Galectin-1-Asialofetuin Interaction Is Inhibited by Peptides Containing the Tyr-Xxx-Tyr Motif Acting on the Glycoprotein. *Chembiochem* **2010**, *11*, 228-234.

4. Kover, K. E.; Weber, E.; **Martinek, T. A.**; Monostori, E.; Batta, G., (¹⁵N and (¹³C Group-Selective Techniques Extend the Scope of STD NMR Detection of Weak Host-Guest Interactions and Ligand Screening. *Chembiochem* **2010**, *11*, 2182-2187.

5. Hetenyi, A.; Fulop, L.; **Martinek, T. A.**; Weber, E.; Soos, K.; Penke, B., Ligand-induced flocculation of neurotoxic fibrillar A beta(1-42) by noncovalent crosslinking. *Chembiochem* **2008**, *9*, 748-757.

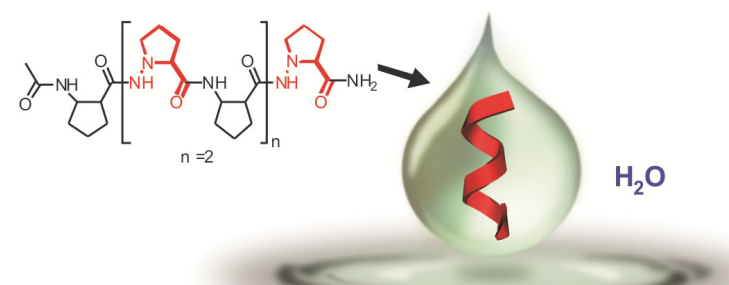
6. Gyarmati, C. Z.; Palinko, I.; Bokros, A.; **Martinek, T. A.**; Bernath, G., The cis-trans isomerisation of homologous 2-hydroxycycloalkancarboxylic acids under basic conditions. *Chinese Journal of Chemistry* **2006**, *24*, 1792-1795.

7. Benedek, G.; Palko, M.; Weber, E.; **Martinek, T. A.**; Forro, E.; Fulop, F., Efficient synthesis of hydroxy-substituted cispentacin derivatives. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 3724-3730.

8. Fulop, F.; Palko, M.; Forro, E.; Dervarics, M.; **Martinek, T. A.**; Sillanpaa, R., Facile regio- and diastereoselective syntheses of hydroxylated 2-amino-cyclohexanecarboxylic acids. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 3214-3220.

1.4 Az alternáló enantiomerekkel kapcsolt *trans*- α -2-aminociklopentánkarbonsav oligomerek (H-[(1*S*,2*S*)-ACPC-(1*R*,2*R*)-ACPC]_n-NH₂) stabilis poláris szál konformációt vesznek fel, ami a másodlagos szerkezetből következően nanostrukturált (amiloid-típusú) fibrillumokat képez [5]. Ezekkel az eredményekkel alátámasztottuk, hogy azonos konstitúció mellett csupán sztereokémiai kontrollal a β -peptid foldamerek valamennyi főbb másodlagos szerkezeti típusa kialakítható (3. ábra).

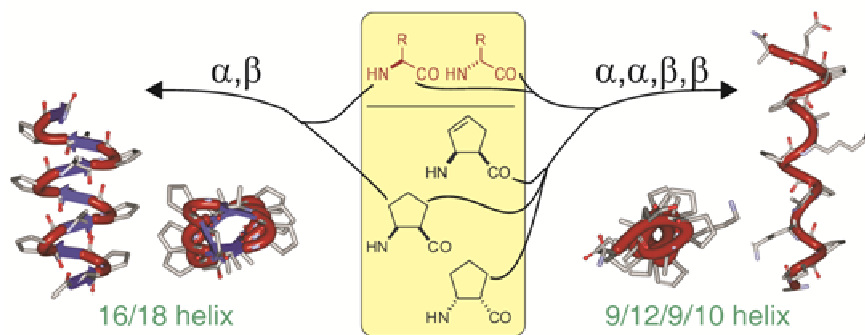
1.5 Alternáló mintázatban beépített ciklusos azapeptid építőelemek segítségével megmutattuk, hogy a sztereokémiai kontroll az alifás foldamerek körére kiterjeszthető [6]. A módosított H-kötés pillérek megerősítették a gerinc H-kötési hálózatát, ezáltal vizes oldószerben is sikerült a másodlagos szerkezeteket megőrizni H12 és H10/12 hélixek esetén is. Ezzel új módszert mutattunk be a foldamerek gerincben történő stabilizálására anélkül, hogy az oldalláncokat erre a célra feláldoztuk volna (4. ábra). Ezek az eredmények rámutattak, hogy nem kell minden sztereocentrumot megkötnünk ahhoz, hogy a másodlagos szerkezetet kiépíthessük.



4. ábra

1.6 A sztereokémiai programozás elvét alkalmazva olyan β -peptid szekvenciákat terveztünk, ahol a peptidkötések orientációja hármas periódust mutat. Ezzel kikényszerítettük az irodalomban addig ismeretlen H14/16 hélix létrejöttét [2], amit kísérletesen is igazoltunk. Megmutattuk, hogy a kvázi-random térkémiai információ megakadályozza a szerkezet létrejöttét még teljesen azonos konstitúció mellett is. Ez a szerkezet túlmutat az egyszerű homogén orientációjú vagy az alternáló irányítottágú hélixeken, és példát ad a sztereokémiai kódolás hatékonyságára. Megmutattuk, hogy ezekben a szekvenciákban sem szükséges minden sztereocentrumot definiálni, így lehetővé vált, hogy minden harmadik aminosav egység proteinogén oldalláncot hordozzon.

1.7 Térkémi kódolással $\beta\beta\alpha$ -peptid foldamereket terveztünk *de novo*, amelyekben az aminosavak konstitúciós mintázata hármastagolódást mutat, de a peptidkötések orientációja alternáló. Ez a bonyolult rendszer a tervezett új H9-12 hélixet adta eredményül annak ellenére, hogy az α -aminosavakkal jelentős mértékű flexibilitást vittünk a láncba [2]. A kontroll szekvencia a kvázi-random térkémi kódolással nem adott hélixet. A másodlagos szerkezet ígéretes módon, és az addig az irodalomban közölt rövid homokirális α,β -láncokkal ellentétben monoszubsztituált α -aminosavakkal is stabilisnak mutatkozott (Aib egységek nélkül). Továbbá vizes közegben is mutatott maradék helicitást.



5. ábra

1.8 Igazoltuk, hogy az α -aminosavak aránya tovább növelhető anélkül, hogy elveszítenénk a sztereokémiai mintázattal tervezett másodlagos szerkezetet. Új alternáló peptid-irányítottságú $\alpha\beta$ -peptideket terveztünk proteínogén oldalláncokkal. Kísérletesen alátámasztottuk, hogy a lánc egy új H16/18 hélix geometriát vesz fel, ami a közlemény megjelenésekor a legnagyobb átmérőjű peptid foldamer hélix volt ($i - i + 4$ H-kötések jelenlétével) [7]. Az α -aminosavegységek a β -redőben ismert lokális konformációt vették fel, mégis a gerinc fő görbülete helikális maradt a sztereokémiai mintázatnak megfelelően (5. ábra).

1.9 A térkémi programozás további alkalmazásával alternáló orientáltságú $\alpha\alpha\beta\beta$ -peptid hélixeket terveztünk. Oldatfázisú szerkezetfinomítás és más kiegészítő módszerek azt mutatták, hogy ez az általunk először közölt H9/12/9/10 hélix képződéséhez vezet [7]. Fontos kiemelni, ennél a szerkezetnél vizes közegű szerkezetfinomítást is tudunk végezni, ami jól jelzi a hélix típus inherens stabilitását. További előnye ennek a másodlagos szerkezetnek, hogy az α -aminosavak elrendeződése diverz biomimetikus felszín létrehozását teszi lehetővé.

Az értekezés alapját adó közlemények

1. Mandity, I. M.; Weber, E.; **Martinek, T. A.***, Olajos, G.; Toth, G. K.; Vass, E.; Fulop, F., Design of Peptidic Foldamer Helices: A Stereochemical Patterning Approach. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 2171-2175.
2. **Martinek, T. A.**; Fulop, F., Peptidic foldamers: ramping up diversity. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 687-702.
3. **Martinek, T. A.**; Fulop, F., Side-chain control of beta-peptide secondary structures - Design principles. *European Journal of Biochemistry* **2003**, *270*, 3657-3666.
4. **Martinek, T. A.**; Toth, G. K.; Vass, E.; Hollosi, M.; Fulop, F., cis-2-aminocyclopentanecarboxylic acid oligomers adopt a sheetlike structure: Switch from helix to nonpolar strand. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, *41*, 1718-1721.
5. **Martinek, T. A.**; Mandity, I. M.; Fulop, L.; Toth, G. K.; Vass, E.; Hollosi, M.; Forro, E.; Fulop, F., Effects of the alternating backbone configuration on the secondary structure and self-assembly of beta-peptides. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 13539-13544.
6. Hetenyi, A.; Toth, G. K.; Somlai, C.; Vass, E.; **Martinek, T. A.***, Fulop, F., Stabilisation of Peptide Foldamers in an Aqueous Medium by Incorporation of Azapeptide Building Blocks. *Chemistry-a European Journal* **2009**, *15*, 10736-10741.
7. Berlicki, L.; Pilsl, L.; Weber, E.; Mandity, I. M.; Cabrele, C.; **Martinek, T. A.***, Fulop, F.; Reiser, O., Unique alpha,beta- and alpha,alpha,beta,beta-Peptide Foldamers Based on cis-beta-Aminocyclopentanecarboxylic Acid. *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, *51*, 2208-2212.
8. Hetenyi, A.; Szakonyi, Z.; Mandity, I. M.; Szolnoki, E.; Toth, G. K.; **Martinek, T. A.***, Fulop, F., Sculpting the beta-peptide foldamer H12 helix via a designed side-chain shape. *Chemical Communications* **2009**, 177-179.
9. Mandity, I. M.; Fulop, L.; Vass, E.; Toth, G. K.; **Martinek, T. A.***, Fulop, F., Building beta-Peptide H10/12 Foldamer Helices with Six-Membered Cyclic Side-Chains: Fine-Tuning of Folding and Self-Assembly. *Organic Letters* **2010**, *12*, 5584-5587.
10. Hetenyi, A.; Mandity, I. M.; **Martinek, T. A.**; Toth, G. K.; Fulop, F., Chain-length-dependent helical motifs and self-association of beta-peptides with constrained side chains. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 547-553.
11. Szolnoki, E.; Hetenyi, A.; **Martinek, T. A.***, Szakonyi, Z.; Fulop, F., Self-association-driven transition of the beta-peptidic H12 helix to the H18 helix. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, *10*, 255-259.

4.3 Transzmissziós elektronmikroszkópiás és dinamikus fényszórási mérésekkel igazoltuk, hogy a szabad N-terminálissal rendelkező homokirális *transz*-ACHC oligomerekből épített H14 hélixek multilamelláris vezikulákat képeznek, amelyek átmérője a 20-180 nm tartományban van [12]. A vezikulák létrejötte gyors folyamat és ultrahangos kezeléssel részlegesen dezaggregálhatók. A kezelés után 1 nappal a vezikuláris szerkezet helyreáll. Az eredmények arra utalnak, hogy a vezikulákat határoló membránt a vertikálisan amfil β -peptid hélixek alkotják, amelyek hélixköteg motívumba rendeződnek.

4.4. A nanoméretű vezikulákat megfigyeltük az alternáló H10/12 hélixeknél is, ha ACHC oldalláccal alakítottuk ki a szerkezetet [9]. A vizes oldatban kialakuló nano részecskéket TEM és DLS segítségével detektáltuk, a vezikulák a 100 nm-es mérettartományban alakultak ki, de alakjuk kevésbé volt szabályos mint a H14 hélixekből kialakuló részecskéké.

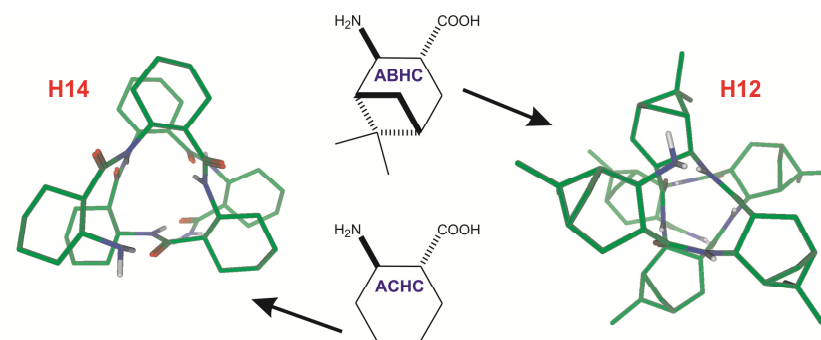
Eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

A foldamerek kutatásának fő hajtóereje, hogy új biomimetikus rendszerek létrehozását teszik lehetővé, és kiemelt alkalmazási lehetőségük a modern hatóanyagfelfedezésben rejlik. A foldamerek jelenleg ismert biológiai alkalmazásait az értekezés 2.6 fejezetében röviden összefoglaltam, mert az eddig végzett munkánk célkitűzései is szorosan kapcsolódtak a kémiai-biológiai vonatkozásokhoz: vízben is stabilis másodlagos szerkezetek létrehozása, proteinogén oldalláncok bevitele az új helikális struktúrákba, és általában a szerkezeti diverzitás növelése szintetikusan hozzáférhető építőelemek segítségével. Feltehetően az itt bemutatott eredmények és módszerek közvetlenül is hasznosnak bizonyulnak majd a foldamer hatóanyagok felfedezésében.

Gyógyszerkutató szempontból jelenleg az egyik legnagyobb kihívás a protein-protein és protein-szénhidrát kölcsönhatások befolyásolása, mert ezek a klasszikus kismolekulás hatóanyagokkal nehezen támadhatók. A foldamerek jövőbeni, szélesebb rétegeket érintő gyakorlati alkalmazása ezen a területen várható. Ezekbe a kutatásokba mi is bekapcsolódtunk és keressük az általunk előállított foldamerek felhasználási lehetőségeit. Egyrészt a 2.6 fejezetben bemutatott protein-hélix interfész paradigmától elszakadva általánosabb megközelítésben vizsgáljuk bizonyos oldószernek kitett kölcsönhatási felszínű (undruggable) fehérjék és foldamerek közötti kölcsönhatásokat. Másrészt a protein-protein kölcsönhatások esetén nagy problémát jelent a delokalizált alkötőhelyekre történő egyidejű optimalizálás. Ennek a megoldására fejlesztünk módszert, ami a kismolekulás hatóanyagfelfedezés területéről ismert fragmens alapú módszer foldamerekre adaptált változata.

2. Oldalláncok alakjának hatása a másodlagos szerkezetre

2.1 Megállapítottuk, hogy a nagy térkitöltésű oldalláncok közötti hidrofób kölcsönhatások és a szterikus tasztítás a helikális szerkezet kialakulását erősen befolyásolhatja. Egy új apopinán-származék β -aminosavat, (1R,2R,3R,5R)-2-amino-6,6-dimetil-biciklo[3.1.1]heptán-3-karbonsavat (*transz*-ABHC) alkalmaztunk, amelynek nagy térkitöltésű oldallánca megakadályozza a $i - i+3$ hidrofób vonzó kölcsönhatásokat és szterikus ütközést okoz. NMR, ECD és *ab initio* modellezési eredmények igazolták, hogy a homokirális *transz*-ABHC homooligomerek uralkodó térszerkezete a H12 hélix. DOSY NMR spektroszkópiával kimutattuk azt is, hogy ezek a hélixek önasszociációt mutatnak metanolban. Ezzel egy új módszert írtunk le a H12 hélix stabilizálására (6. ábra) [8].

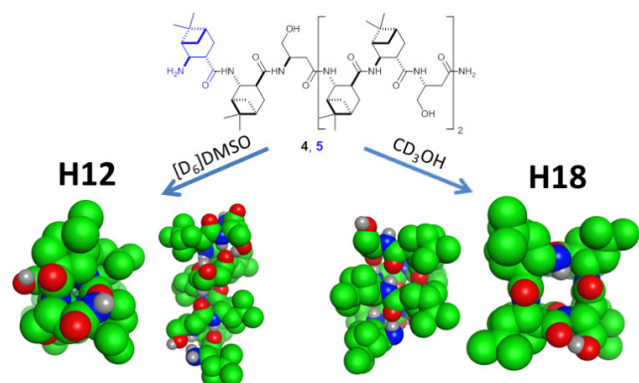


6. ábra

2.2 Kimutattuk, hogy a ciklohexán oldallánccal felépített alternáló heterokirális láncok is képesek felvenni a H10/12 hélix geometriát, de ennek stabilitása kisebb [9]. Konformációs polimorfizmust figyeltünk meg, ahol kémiai kicserélődés zajlik le a major H10/12 hélix és egy minor konformáció között. Elméleti számolások és az NMR eredmények azt sugallják, hogy a minor konformáció egy H18/20 hélix. NMR, ECD és molekulamodellezési eredmények azt mutatták, hogy a *cis*-aminociklohex-3-én-karbonsav (*cis*-ACHEC) monomerek ugyanebben a sztereokémiai mintázatban predominánsan a H10/12 hélixet veszik fel mert kevésbé rigid oldalláncot jobban tolerálja ez a másodlagos szerkezet. Kísérletet tettünk *diexo*-(2R,3S)-3-aminobiciklo[2.2.1]hept-5-én-2-karbonsav és *diexo*-(2S,3R)-3-aminobiciklo[2.2.1]hept-5-én-2-karbonsav monomerekkel az alternáló H10/12 hélix létrehozására. Azonban az NMR és ECD mérések valamint az *ab initio* és molekuláris mechanikai számítások igazolták, hogy az áthidalt, nagytérkitöltésű és rigid ciklusos oldalláncok a molekula makrociklusos konformációba történő önrendeződését segítik elő.

3. Láncossz-függő másodlagos szerkezetek

3.1 A különböző láncosszúságú homokirális *transz*-ACHC oligomerek nagyfelbontású szerkezetét spektroszkópiásan meghatározva és *ab initio* modellezéssel vizsgálva kimutattuk, hogy a H14 $\rightarrow$ H10 láncosszfüggő módon megtörténik. A H10 hélix a tetramerre jellemző, míg a H14 hélix már pentamer esetén megjelenik [10]. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a β -peptid foldamerek nemcsak stabilis másodlagos szerkezetek, hanem a konformációs polimorfizmus vonatkozásában is biomimetikusnak tekinthetők még a rigid ciklohexán-vázás oldalláncokkal is. Alátámasztottuk, hogy a H14 hélix kialakulása a H10 hélixen keresztüli nukleációs útvonalon megy végbe.

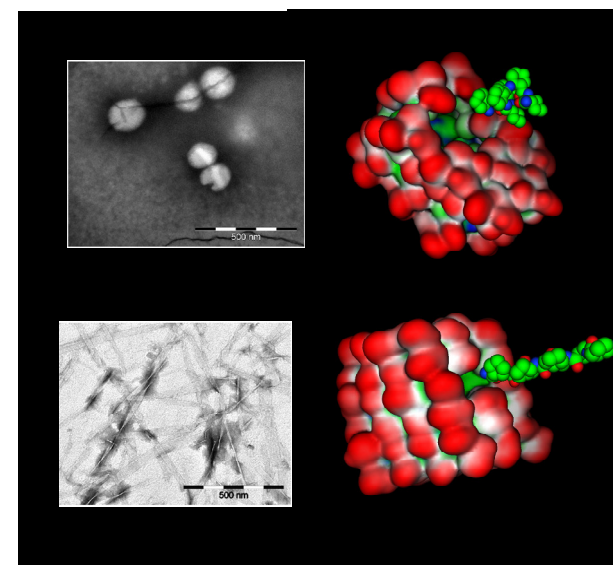


7. ábra

3.2 Megmutattuk, hogy a sztérikus oldallánc taszítással kikényszerített H12 hélixhez legalább kettő potenciális ABHC-ABHC ütközést kell a szekvenciákba tervezni heptamereknél. Az így kialakított héliceket ABHC monomerekkel meghosszabbítva koncentráció- és oldószer-függő másodlagos szerkezeteket figyeltünk meg. DMSO- d_6 -ban továbbra is a H12 hélix maradt a domináns konformáció, de 100 μ M koncentráció fölött CD_3OH -ban kialakult a H18 hélix. A koncentráció-függő DOSY és ECD mérések alátámasztják, hogy a konformációs átalakulás a hélixek közötti kölcsönhatásnak köszönhető. Továbbá NMR mérésekkel igazoltuk, hogy ebben az asszociációban a laterális szolvofób kölcsönhatások mellett a hélixek fej-láb illeszkedésének is szerepe van. Ez a rendszer lehetővé tette a H18 hélix felfedezését, és ezzel mi írtunk le elsőként $i + i+4$ H-kötésekkel stabilizált homokirális peptid foldamer hélixet (7. ábra), ami a közlés idején a legnagyobb átmérőjű ilyen típusú struktúra volt [11].

4. Foldamerek szupramolekuláris alkalmazása: nanostrukturált rendszerek

4.1 Megvizsgálva a Z6 szál nanoméretű struktúráját megállapítottuk, hogy a *cis*-ACPC homooligomerek az önasszociáció során fibrilláris szerkezetet vesznek föl (8. ábra) [12]. A fibrillumok szélessége és hossza jelentősen függ a peptidszekvencia hosszától és az időtől. Heptamer esetén 1 nap után 30-50 nm szélességű csavart fibrillumokat kaptunk, míg oktamer esetében 100-400 nm széles szalagokat figyeltünk meg. A fibrillumok finomszerkezetére alkotott modell szerint a rendszer magját redőzött szendvics rétegek alkotják, amiket hosszirányban hidrogénkötések, laterálisan pedig hidrofób kötőerők tartanak össze. A nanostrukturákat a β -peptid foldamerek körében először figyeltük meg és ez új utat nyithat az anyagtudományi alkalmazások irányába.



8. ábra

4.2 Megállapítottuk, hogy a fibrillum képződés az alternáló heterokirális *transz*-ACPC hexamer által kialakított poláris szál esetében is megfigyelhető [5]. A fűrészszerű 6 nm széles fibrillumok egységesen helikális csavarodást mutattak 60 nm-es periódussal. A foldamer szálak a β -redős, fibrillumképzésre hajlamos α -peptidekkel analóg módon viselkednek, és ez is további alátámasztást adja a másodlagos szerkezetük geometriájának. Ezzel rámutattunk, hogy a sztereokémiai kontroll a nano mérettartományban is befolyásolja a morfológiát.