MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

# PEPTID FOLDAMEREK: SZERKEZET ÉS ALKALMAZÁS

MARTINEK TAMÁS

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerkémiai Intézet 2012

# Tartalom

1	Bev	Bevezetés4				
2	Iro	dalmi áttekintés	6			
	2.1	Foldamerek áttekintése és csoportosítása	6			
	2.2	Homogén alifás foldamerek	7			
		2.2.1 β-Peptidek	7			
		2.2.2 γ-Peptidek	10			
		2.2.3 Azapeptidek és oligoureák	11			
	2.3	Heterogén alifás foldamerek	12			
		2.3.1 αβ-Peptid foldamerek	13			
		2.3.2 ααβ, βαα, αββ és βαβ motívumok	14			
	2.3.3 α,γ-peptidek		15			
	2.3.4 β,γ-peptidek		15			
	2.4 Sztereokémiai kontroll		16			
	2.5	Foldamerek tercier/kvaterner szerkezete és nanostrukturált rendszerek	16			
		2.5.1 Hélixkötegek egységenként történő tervezésével	16			
		2.5.2 Hélixkötegek ismert proteinekből kiindulva	18			
		2.5.3 Nanostrukturált rendszerek	19			
	2.6	Biológiai alkalmazások	19			
3	Mó	dszerek	22			
	3.1	Peptidszintézis	22			
	3.2	Szerkezetvizsgálatok	23			
		3.2.1 NMR spektroszkópia	23			
		3.2.2 Elektronikus cirkuláris dikroizmus	24			
		3.2.3 Infravörös színképek és vibrációs cirkuláris dikroizmus	24			
	3.3	Részecskeméret és morfológia	25			
		3.3.1 Diffúziós gradiens ekho NMR spektrumok (DOSY)	25			
		3.3.2 Transzmissziós elektronmikroszkópia	25			
		3.3.3 Dinamikus fényszórás	25			
	3.4	Molekulamodellezés és szerkezetfinomítás	26			
		3.4.1 Szerkezetfinomítás molekuláris mechanikai szinten	26			
		3.4.2 Ab inito kvantummechanikai szerkezeti optimalizálások	26			

4	Ere	edmények és diszkusszió	.27			
	4.1	Foldamerek térszerkezetének sztereokémiai szabályzása	.27			
		4.1.1 Szabályok megállapítása, elvi megfontolások	.27			
		4.1.2 Z6-szál létrehozása gyűrűs oldalláncokkal sztereokémiai kontroll mellett	.31			
		4.1.3 H10/12 hélix és poláris szál létrehozása gyűrűs oldalláncokkal és alternáló sztereokémiai mintázattal	.35			
		4.1.4 Sztereokémiai kontroll kiterjesztése aza,β-peptid heterogén szekvenciákra	.39			
		4.1.5 Foldamer hélixek <i>de novo</i> létrehozása proteinogén oldalláncokkal: sztereokémia programozás kiterjesztése	ui .46			
		4.1.6 Az általánosított sztereokémiai programozás alkalmazása: új αβ és ααββ foldamerek	.53			
	4.2	Oldalláncok alakjának hatása a másodlagos szerkezetre	.58			
		4.2.1 A H12 hélix stabilizálása oldalláncok sztérikus kölcsönhatásának segítségével.	.58			
		4.2.2 Az oldallácok alakjának hatása a H10/12 hélix stabilitására	.63			
	4.3	Lánchossz-függő másodlagos szerkezetek	.67			
		4.3.1 Lánchossz-függő H10 -> H14 hélix átmenet megfigyelése	.67			
		4.3.2 Nagy átmérőjű H18 hélix létrehozása sztérikus-kontroll alatt lánchosszabbítással	.71			
	4.4	Foldamerek szupramolekuláris alkalmazása: nanostrukturált rendszerek	.76			
		4.4.1 Foldamer szálak fibrillumai	.76			
		4.4.2 Foldamer hélixek vezikulái	.80			
5	Öss	szefoglalás	.84			
6	Gya	akorlati hasznosítás lehetőségei és kitekintés	.89			
7	Az	értekezés alapját adó közlemények	.90			
8	Kap	pcsolódó közlemények	.92			
9	Eg	yéb közlemények	.94			
10	0 Irodalomjegyzék95					
11	1 Köszönetnyilvánítás103					

## Rövidítések és jelölések

$\Delta\delta/\Delta T$	kémiai eltolódás hőmérsékleti koefficiense			
3Ј	vicinális skaláris csatolás			
ABHC	2-amino-6,6-dimetil-biciklo[3.1.1]heptán-3-karbonsav			
ABHEC	3-aminobiciklo[2.2.1]hept-5-én-2-karbonsav			
ACBC	2-amino-ciklobután-karbonsav			
ACHC	2-amino-ciklohexán-karbonsav			
ACHEC	2-aminociklohex-3-én-karbonsav			
ACPC	2-amino-ciklopentán-karbonsav			
Aib	α-amino-izovajsav			
Boc	terc-butoxikarbonil védőcsoport			
CIP	Cahn-Ingold-Prelog konvenció			
DCC	diciklohexilkarbodiimid			
DCM	diklórmetán			
DIPEA	N,N-diizopropiletilamin			
DLS	dinamikus fényszórás			
DMSO-d <sub>6</sub>	perdeuterált dimetil-szulfoxid			
DOSY	diffúzió-kontrollált NMR spektroszkópia			
ECD	elektronikus cirkuláris dikroizmus			
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonil védőcsoport			
Gpn	gabapentin			
H## hélix	##-tagú H-kötéses gyűrűkkel stabilizált hélix			
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurónium hexafluorfoszfát			
H-kötés	hidrogén-kötés			
HOBT	hidroxibenzotriazol			
HPLC	nagyteljesítőképességű folyadékkromatográfia			
LC	folyadékkromatográf			
LED	longitudinális örvényáram lecsengés			
MBHA	metilbenzhidrilamin			
MC	Monte Carlo szimuláció			
MD	molekuláris dinamikai szimuláció			
MS	tömegspektrométer			
NMR	mágneses magrezonancia			
NOE	nuclear Overhauser effektus			
NOESY	nuclear Overhauser effektus spektroszkópia			
Oxd	4-metil-5-karboxi-oxazolidin-2-on			
PCM	polarizálható kontinuum oldószer modell			
PFGSE	térerőgradiens impulzusok által kiváltott spin-ekho			
PNS	peptid-nukleinsav			
PVDF	polivinilidénfluorid polimer			
RMSV	négyzetes távolságeltérések átlagának gyöke			
ROESY	forgó koordináta rendszerben megvalósított nuclear Overhauser effektus spektroszkópia			
SA	szimulált hűtés algoritmus			
TEM	transzmisszós elektronmikroszkópia			
TFA	trifluorecetsav			
TFFH	tetrametilfluorformamidinium hexafluorfoszfát			
TOCSY	totál korrelációs spektroszkópia			
VCD	vibrációs cirkuláris dikroizmus			

### 1 Bevezetés

A foldamer fogalom a biomolekulák szerkezeti tulajdonságainak általánosítását foglalja magába. Azokat a mesterséges láncmolekulákat nevezzük foldamereknek, amelyek képesek programozható önrendeződésre, és ezáltal szabályos, jól definiált térszerkezetek létrehozására. Az irántuk való érdeklődést a biomimetikus megközelítés kihívása váltotta ki, az a kérdés, hogy vajon lehetséges-e utánozni a biomolekulák sajátos szerkezeti tulajdonságait szintetikus szekvenciákkal. A válasz hamarosan meg is érkezett, ugyanis, szabályos szerkezeteket és önrendeződő viselkedést figyeltek meg mesterséges építőelemekből előállított oligomereknél. Ezek a korábban nem létező szekvenciák ugyanazoknak a szabályoknak engedelmeskedve képesek önrendeződésre, mint a proteinek vagy a nukleinsavak. Alapvető fizikai-kémiai szempontból a monomerek sztérikus tulajdonságai, a szolvofób hatások valamint az elektrosztatikus kölcsönhatások és a H-kötések illeszkedése nagyon hasonló módon formázzák a téralkatot. Ez nem jelenti azt azonban, hogy az önrendeződés hajtóereje és útja pontosan ugyanolyan beállításokat nyer. A különböző kölcsönhatások aránya szabályozható az építőelemek jellemzőivel, és ezzel a kémiai diverzitás kiteljesedhet, valamint a biomolekuláknál megszokott komplexitás megjelenhet (1. ábra).



**1. ábra.** Foldamerek mint mesterséges önrendeződő rendszerek a kémiai biológiában.<sup>1</sup>

A diverzitást tekintve a természetes  $\alpha$ -aminosavakból felépülő peptidek/proteinek legközelebbi rokonai a  $\beta$ -peptidek, amelyekben egy pótlólagos metilén csoport helyezkedik el a gerinc peptidkötései között (2. ábra). Ebben az esetben a H-kötési lehetőségek és annak alapvető jellemzői megmaradnak, a szolvofób kölcsönhatások ugyanúgy rendelkezésre állnak, míg a gerinc szénatomjainak sztereokémiája új lehetőségeket biztosít a térszerkezet befolyásolására. A kémiai térben jóval távolabb, mégis a foldamerek között találjuk az

oligoarilén-típusú láncmolekulákat, amelyekből a H-kötésre képes funkciós csoportok és a sztereocentrumok is teljességgel hiányoznak. Ezeknél csak a szolvofób kölcsönhatások és a monomerek alakja befolyásolja az önrendeződést.

A kémiai sokféleségi skála bejárása mellett egyaránt fontos a foldamerekben rejlő térszerkezeti komplexitás felderítése és kiaknázása. Ez vezet valójában a biológiai molekulákhoz hasonló szerkezeti viselkedéshez és funkciókhoz. Legfőbb célunk az volt, hogy bővítsük ismereteinket a 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 hozájárult ahhoz, hogy lehetővé vált a foldamerek térszerkezeti elemeinek racionális, esetenként *de novo* tervezése. Az egyik legfontosabb hajtóerő a foldamerek vizsgálatához az, hogy a biomimetikus viselkedésük miatt lehetővé válik kölcsönhatásuk más biomakromolekulákkal. Ugyanakkor az élő rendszerek számára "ismeretlen" kémiai összetételük megóvja őket a már jól ismert peptid és protein terapeutikumokra leselkedő káros behatásoktól. Így ezek az önszerveződő láncmolekulák protein mimetikumként a hatóanyagok egy új osztályát képezhetik a jövőben. Ezért a mi érdeklődésünk is ebbe az irányba fordult a közelmúltban.

E dolgozat célja, hogy bemutassa a foldamerek kémiájának és kémiai biológiájának területén végzett kutatásainkat. Az eredmények négy főbb téma köré csoportosíthatók: (i) foldamerek szerkezetének sztereokémiai szabályzása, (ii) oldalláncok alakjának és térkitöltésének hatása a másodlagos szerkezetre, (iii) lánchossz-függési vizsgálatok és konformációs polimorfia valamint (iv) foldamer építőelemekből konstruált nanostrukturált rendszerek. A dolgozat külső hivatkozásai felső indexben találhatók. A saját munkáinkra kapcsos zárójelben megadott számmal utalunk.

### 2 Irodalmi áttekintés

### 2.1 Foldamerek áttekintése és csoportosítása

A biológiai működésért felelős makromolekulák meglehetősen korlátozott számú építőelemből épülnek fel, és az evolúciós időskálán fejlődtek komplex, önrendeződő struktúrákká. Ma már ismert, hogy ezek az önrendeződési folyamatok milyen elveket követnek.<sup>2,3</sup> Azonban az önrendeződő komplex szerkezetek racionális tervezését nem kell az α-aminosavak polimerjeinek körére korlátoznunk, valójában ezek az elvek/szabályok általánosíthatók minden olyan láncmolekulára, amely hajlamos önrendeződően feltekeredni. Ezzel a lépéssel jutunk el a foldamerek fogalmához. A foldamer-kémia napjainkban lép felnőtt korba, mint a kémia egy önálló ága. Felfedezésük és a létezésük deklarálása47 óta más területeken is megjelentek mint eszközök (pl. kémiai biológia) vagy mint az alapkutatás tárgyai (pl. nanostrukturált rendszerek). Ha a foldamereket egy igen tág definíció szerint mesterséges feltekeredett molekula-szerkezeteknek ("artificial folded molecular architectures")8 tekintjük, akkor rendkívül sokféle láncmolekula típust kell besorolnunk. Például már a foldamer fogalom megjelenése előtt ismeretesek voltak az önrendeződésre képes PNS láncok9 vagy peptoidok.10 A meglehetősen diverz struktúrákat kétféle csoportosítás szerint tárgyalhatjuk (2. ábra). Az egyik a gerincben található atomok topológiája alapján alifás és aromás foldamerek szerint osztályoz.11 A másik felosztás a kiindulópontot jelentő természetes proteinekhez való hasonlóságot veszi alapul, és így különböztet meg biotikus (pl. α-peptid homológok) és abiotikus foldamereket (pl. oligourea és aromás oligoamidok).12 Tekintettel a kémiai szempontból konzekvensebb megközelítésre, mi az előbbi módszert követjük.



#### 2. ábra. Reprezentatív építőelemek a foldamerekben.

További felosztást lehet még tenni annak alapján, hogy a foldamer láncok a gerincben azonos konstitúciójú vagy sztereokémiájú építőelemeket tartalmaznak-e. Eszerint beszélünk homogén és heterogén foldamerekről. Így az általunk vizsgált rendszerek (β-peptidek, α,β-

peptidek és β,aza-peptidek) egyértelműen az alifás foldamerek közé sorolhatók, és ezen belül homogén és heterogén szekvenciákat is tanulmányoztunk.

#### 2.2 Homogén alifás foldamerek

Az alifás foldamerek formailag az  $\alpha$ -peptid láncokból származtathatók a gerinc homologizálásával és/vagy a peptidkötés, mint H-híd pillér módosításával. Ez a megfogalmazás nem utal azokra a konkrét szintézisutakra, ahogy az építőelemeket előállítják, ezeket a dolgozat nem tárgyalja. Ebben a fejezetben a  $\beta$ - és a  $\gamma$ -peptideket tekintem át, valamint összefoglalom az azapeptidek és oligourea-típusú foldamerek irodalmi hátterét különös tekintettel azokra vonatkozásokra, melyek a saját eredményeinkhez szorosan kapcsolódnak. A tömörség miatt nem térek ki néhány érdekes, ám exotikus alifás foldamer típusra sem (aminoxi-karbonsav-alapú,<sup>13-19</sup> heterociklusos alapvázakra épülő<sup>20-26</sup> és szteroidvázas foldamerek<sup>27-30</sup>), viszont ezeket egy közelmúltban megjelent közleményben összefoglaltuk [2].

#### 2.2.1 β-Peptidek

A  $\beta$ -aminosavak nem a kutatólaboratóriumokban fordultak elő először. A Föld történetének korai időszakában a feltételek adottak voltak a  $\beta$ -aminosavak képződéséhez,<sup>31</sup> jelenlétük valószínűsíthető üstökösökben és aszteroidákban is,<sup>32</sup> sőt biológiai eredetű  $\beta$ aminosavak is léteznek.<sup>33</sup> Számos gazdaságos szintetikus módszer áll rendelkezésre a  $\beta$ aminosavak előállítására, ami a  $\beta$ -peptideket talán a leginkább tanulmányozott foldamerekké tette.



**3. ábra.** A β-peptidek lehetséges szubsztitúciós mintázatai, a konformációs terüket leíró torziók és a leggyakrabban alkalmazott ciklusos oldalláncok.

Konformációs szempontból a gerincben elhelyezkedő két szénatom változatossá teszi a monomereket. Az α-aminosavakhoz képest kibővülő szubsztitúciós mintázatok teljesen új eszközöket adnak a kezünkbe a konformáció szabályozására (3. ábra). A β-aminosavakban a monoszubsztituált származékok mellett lehetővé válik a diszubsztituált építőelemek használata, és ezen belül különös jelentőséggel bírnak a ciklusos β-aminosavak.<sup>34</sup> A lehetséges sztereokémiai kombinációk jelentősége és hatása igen nagy. A szubsztituensek térbelisége általában lényeges paraméter az irodalmi eredmények bemutatásánál is, de ennek vizsgálata fontos célkitűzésünk volt, így ezt az eredmények fejezetben tárgyalom részletesebben.

A β-peptidek esetén az α-aminosavakhoz viszonyítva megnő a konformációs tér a három torziós szög miatt, amelyeket a Balaram-konvenció szerint jelölünk.<sup>35</sup> A látszólag megnövekedett konformációs tér azt a következtetést vonhatná maga után, hogy entropikus okok miatt ezek a láncok csökkent képességet mutatnak az önrendeződésre. Azonban Seebach<sup>6,36,37</sup> és Gellman<sup>38,39</sup> e területen végzett úttörő munkái rávilágítottak, hogy a βpeptidek ezt a hipotézist cáfolják, azaz erős hajlamuk van a rendezett, periodikus szerkezetek kialakítására. Ezt a paradox viselkedést azután blokkolt monomereken és rövid oligomereken végzett *ab initio* kvantumkémiai számítások megmagyarázták.<sup>40-44</sup> A β-peptidek azon tulajdonsága, hogy képesek helikális geometriák felvételére már monomer szinten kódolt és a lokális konformációs preferenciák hatékonyan ellensúlyozzák a megnövekedett konformációs tér miatt bekövetkező entrópiaveszteséget még a nem ciklusos oldalláncú β-aminosavak esetén is.

Számos másodlagos szerkezeti típust tartunk nyilván a β-peptidek körében, valójában többet, mint amennyit a peptidek/proteinek esetén (4. ábra). A másodlagos szerkezetek nevezéktanára a Gellman és DeGrado által javasolt rendszert használjuk,<sup>45</sup> mely a másodlagos szerkezetet stabilizáló H-kötéses pszeudogyűrűk tagszámával adja meg a hélixek geometriáját. Az alsó indexben feltüntett betűk a hélixek helicitásának irányát jelzik (P: jobb menetes, M: balmenetes). Ezt a rendszert redős geometriák esetén ki kell egészítenünk Beke és Perczel által javasolt jelölésekkel.<sup>44</sup> Emellett szálak esetén hozzátesszük a poláris/nem-poláris jelzőt a peptidkötések egyöntetű vagy alternáló irányítottságától függően.

Az első nagyfelbontású szerkezetet a H14 hélixről közölték és a struktúrát homokirális  $\beta^3$ aminosavakkal<sup>36</sup> valamint *transz*-ACHC monomerekkel<sup>38</sup> sikerült stabilizálni. A H14 hélix egy menete három  $\beta$ -aminosavegységet foglal magába, az NH  $\rightarrow$  O=C H-kötések iránya párhuzamos a peptid szekvencia irányával (N  $\rightarrow$  C). Ugyanilyen az irányítottsága a H10hélixnek<sup>46</sup> is, de ebben a nyújtottabb geometriában a H-kötések két aminosavanként alakulnak ki. A H12 hélixben<sup>38</sup> a H-kötések orientációja antiparallel, ami azonos a természetes  $\alpha$ hélixben tapasztalttal, de ennek a hélixnek az átmérője kisebb, mint az  $\alpha$ -hélixé. Ezt a szerkezetet *transz*-orientáltságú öttagú gyűrűs oldalláncok (pl. *transz*-ACPC) stabilizálják. Új szerkezeti motívumnak tekinthető a kis átmérőjű H10/12 hélix,<sup>47-50</sup> amelyben a peptidkötések orientációja alternáló, ugyanis az első ilyen szerkezeteket alternáló  $\beta^2/\beta^3$ -aminosavakkal

építették ki. Ehhez hasonló kevert hélixet a természetesen előforduló gramicidin alkot (βhelix),<sup>51</sup> de ott egy periódusban 6 aminosav van.



**4. ábra.** β-peptidek ismertebb másodlagos szerkezetei oldalláncok nélkül ábrázolva. Az általunk felfedezett nagyátmérőjű hélixeket az Eredmények és diszkusszió fejezetben ábrázoltam. A szerkezetek felett a H-kötéses pszeudogyűrűk tagszáma a hélixek típusát jelöli. Az alsó indexben feltüntett betűk a hélixek helicitásának irányát jelzik (P: jobbmenetes, M: balmenetes). A Balaramféle szögek a szerkezetekre jellemző tipikus torziókat adják meg.

Ahogy fent is említettük, a ciklusos oldalláncú β-aminosavak jelentős szerepet játszanak a szerkezetépítésben. Az utóbbi időszakban, az öttagú és hattagú oldalláncok után a koncepciót kiterjesztették a feszítettebb gyűrűs oldalláncokra is. A 2-amino-ciklobután karbonsav (ACBC) is megjelent a β-peptid foldamer arénában, és az többféle másodlagos szerkezeti motívumot is mutatott. A *transz*-ACBC egységekből épített oligomerek megfelelő lánchossz esetén H12 hélixeket képeztek.<sup>52</sup> A hélixek geometriáját nemcsak a ciklusos oldallánc gyűrűtagszáma, hanem az oldallánc térkitöltése és sztereoelektronikus sajátságai is befolyásolhatják.



5. ábra. Ciklusos oldalláncú β-peptid foldamerek oldószerfüggő feltekeredése.

Nukleozid-származék β-aminosavakból épített szekvenciáknál figyelhető meg, hogy azonos szekvenciák oldószertől függően képeznek szerkezetet (5. ábra): *d*<sub>6</sub>-DMSO-ban és *d*<sub>5</sub>-piridinben H8 hélix,<sup>53</sup> míg CD<sub>3</sub>OH:CDCl<sub>3</sub> 10:90 elegyben pedig H12 hélix.<sup>54</sup> A ciklusos oldalláncok alakjával és térkitöltésével történő szerkezeti szabályozás koncepciójához adott hozzájárulásunkat az eredményeknél részletezem.



6. ábra. β-peptid redő minimál modellek.

A redős szerkezeti típusok esetén minimál modellekben (szál-kanyar-szál) mutatták meg ezek kialakulási lehetőségét. Ezekben a vizsgálatokban a kulcstényező a kanyar motívum kialakítása, mivel a rövid β-peptid szálak konformációja flexibilis; hosszabb láncoknál számolni kellett volna a hélixképződéssel. Az egyik stratégia a redős modell nukleálására a lánc közepébe helyezett konformációsan rigid monomerek használata. A 10-tagú H-kötéses gyűrűt adó L-prolil-glikolsav szegmens segítségével stabilizáltak antiparallel β-peptid redőt (6a. ábra).<sup>39</sup> A H10/12 hélixből ismert  $β^2/β^3$  dipeptid szegmens kanyar-formáló képességét is kihasználták antiparallel poláris redő modell kialakítására úgy, hogy (S)- $β^2$ -(S)- $β^3$  dipeptid szegmenst építettek egy rövid (R,S)- $β^{2,3}$ -aminovakból álló lánc közepébe (6b. ábra).<sup>55,56</sup> Dinipekotinsav szegmenst szintén alkalmaztak erre a célra, itt a kanyar motívum 12-tagú (6c. ábra).<sup>5</sup> Ezen a területen elért eredményeinkre építve számos *eis*z-ACBC homooligomert szintetizáltak és kimutatták, hogy ezek szál-szerű szerkezetet adnak, amik szupramolekuláris kölcsönhatásokkal nanoméretű redős fibrillumokat képeznek.<sup>57-59</sup> Önmagukban szálas szerkezetet alkotó és önasszociációra képes β-peptidek előállítása egyik fontos célkitűzésünk volt.

#### 2.2.2 y-Peptidek

A γ-peptidek homooligomerei eddig kevesebb figyelmet kaptak, de az ismert, hogy az önrendeződés terén a β-peptidekhez hasonló mértékű változatosságot mutatnak.<sup>60</sup> A foldamerekhez kapcsolódó kutatásoknak már az elején kimutatták, hogy  $\gamma^4$ -szubsztitúció esetén  $\gamma$ -H14 hélix alakult ki.<sup>61</sup> Érdekes, hogy később  $\gamma$ -H9 hélixet találtak alternáló láncoknál,

melyeket  $\gamma^4$ -cukoroldalláncot tartalmazó aminosavakból és  $\gamma$ -aminovajsavból szintetizáltak (7. ábra).<sup>62</sup> A funkcionalizált  $\gamma$ -amino-L-prolin  $\gamma^{2,4}$ -ciklusos oldalláncai szál-szerű struktúrához vezettek, amit 9-tagú H-kötéses gyűrűk stabilizáltak.<sup>63</sup> Az elméleti számítások is alátámasztották a  $\gamma$ -H14 and  $\gamma$ -H9 hélixek alapvető stabilitását.<sup>64</sup>



**7. ábra** Az γ<sup>4</sup>-aminosavakból és GABA építőelemekből szintetizált alternáló láncok γ-H9 hélixe. A védőcsoportot elhagytuk és az oldalláncokat Me-csoporttal helyettesítettük az átláthatóság kedvéért.

Gabapentin oligomerek a  $\gamma^{3,3}$ -geminálisan diszubsztituált gerincükkel H9 hélixet és szalagszerű geometriát hoztak létre kristályban.<sup>65</sup> A *transz*- $\gamma^{2,3}$ -ciklopropán oldalláncokkal előállított szekvenciák redős szerkezetet hoztak létre, amit bifurkált H-kötések stabilizáltak.<sup>66</sup> Fontos volt ezeknék az anyagoknál, hogy a redőket egy nem peptid típusú hajtűkanyarral tartották egyben,<sup>67</sup> és a szálak közötti irreguláris (C-H---O=C) H-kötések is hozzájárultak a stabilitáshoz. Ugyanakkor homokirális *transz*- $\gamma^{2,3}$ -dioxolán szekvenciák 7-tagú H-kötéses gyűrűkkel kialakuló szál struktúrát adtak. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy csakúgy, mint a  $\beta$ -peptideknél a gyűrűs oldalláncok mérete jelentősen képes befolyásolni a másodlagos szerkezetet.

#### 2.2.3 Azapeptidek és oligoureák

Az azapeptid motívum formailag a  $\beta$ -peptid szerkezetből úgy származtatható, hogy a  $\beta^3$ szenet nitrogénre cseréljük. Ennek jelentős hatása van a gerinc H-kötési tulajdonságaira. Az azapeptid homooligomerek jellemzően olyan szerkezeteket vesznek fel, amiket az ún. hidrazino-kanyar stabilizál, amelyben a legfontosabb szerkezeti elem a bifurkált H-kötés (8. ábra).<sup>68,69</sup> Azapeptid láncok makrociklusai szintén jól definiált, H-kötéses szerkezetet vesznek fel, ahol a nitrogének inverziója gátolt.<sup>70</sup> Az azapeptid motívum erős H-kötéseinek kihasználása hélixek protikus oldószerben való stabilizálására egy lényeges aspektusa volt munkánknak.



8. ábra. Az azapeptid gerinc szerkezete és a bifurkált H-kötéssel létrejövő hidrazino-kanyar.

Az oligoureák esetében a legközelebbi rokont a γ-peptid sorozatban találjuk meg. Ha ott kicseréljük a γ<sup>3</sup>-szenet nitrogénre, akkor jutunk el az irodalomban tanulmányozott oligourea szekvenciákhoz. A karbamid funkciós csoport már önmagában is az egyik legerősebb H-kötés pillér és ezt tovább fokozza a bifurkált H-kötés lehetősége és a rigid szerkezet. Nemrégiben kimutatták, hogy az oligourea szekvenciák H14 hélixet alakítanak ki, ami nagyon hasonlít a γ-H14 hélixre (9. ábra).<sup>71-73</sup> A Röntgen-szerkezet vizsgálata alapján megállapították a bifurkált H-kötések jelenlétét a gerincben.<sup>74</sup> Ezeknek az igen stabilis szerkezeteknek további alkalmazására is kísérletet tettek.<sup>75</sup>



9. ábra. A bifurkált H-kötésekkel stabilizált oligourea H14 hélix a Röntgen-szerkezet alapján.<sup>74</sup>

### 2.3 Heterogén alifás foldamerek

A foldamerek diverzitása nemcsak a homooligomerek szintjén képzelhető el. A különféle építőelemek kombinálhatók egyetlen szekvenciában is, ilyenek pl. a  $\alpha,\beta$ -peptidek vagy a  $\beta,\gamma$ peptidek, amelyeket itt tárgyalunk. Ezek a kevert oligomerek is képesek a programozott önrendeződésre és könnyen belátható, hogy a lehetséges kombinációk száma csillagászati. Természetesen a képzeletnek határt szabnak a kémiai szintézis korlátai mind a monomerek gazdaságos előállíthatóságát, mind pedig a különböző típusú építőelemek kapcsolási technikáit tekintve. Jelen dolgozatban nem térek ki az aromás és alifás monomerek különböző kombinációjára,<sup>76</sup> az  $\alpha$ ,aminoxikarbonsav foldamerekre<sup>77,78</sup> és az egyelőre talán kevésbé általánosítható jelenségeket mutató rövid  $\beta,\alpha,\gamma$ - és  $\beta,\alpha,\delta$ -peptidekre.<sup>79</sup> A hivatkozás

ezekre az összetett szekvenciákra esetenként bonyolulttá válhat, emiatt a következő jelölésmódot követjük. A vesszővel elválasztott listák általánosan a megadott építőelemeket tartalmazó szekvenciákat jelölik, pl  $\alpha$ , $\beta$ :  $\alpha$ - és  $\beta$ -aminosav tartalmú láncok, függetlenül a konkrét szekvenciától, míg a vessző nélküli listák a konkrét ismétlődő motívumot adják meg, pl.  $\alpha\beta\beta$ : a láncban az  $\alpha$ -aminosavmaradék után két  $\beta$ -aminosavmaradék következik.

### 2.3.1 $\alpha\beta$ -Peptid foldamerek

Minthogy az  $\alpha$ -aminosavak könnyen hozzáférhetőek, beépítésük a peptid foldamerekbe kézenfekvő lehetőséget nyújt a szerkezeti és oldallánc diverzitás növelésére anélkül, hogy elrontanánk a szekvencia hidrolázoknak való ellenálló képességét. Először  $\alpha\beta$  ismétlődő egységeket tartalmazó láncokat vizsgáltak. Kimutatták, hogy a merev ciklusos oldalláncok (pl. ciklopropán és ciklopentán) nagyban elősegítik az önrendeződést  $\alpha\beta$ -peptidekben.<sup>80,81</sup> Az (*S*,*S*)-ACPC egységek L- $\alpha$ -aminosavval történő kombinációja hélixek kialakulásához vezetett, de ezek kevésbé bizonyultak rigidnek, mint az idevágó homo- $\beta$ -peptid szekvenciák. Hexamerek, oktamerek egészen pentadekamerig kevert távolható NOE-kat mutattak NMRben, amik a H11 és a H14/15 hélixek egyidejű megjelenésére utaltak oldatfázisban (10. ábra).<sup>81,82</sup>



**10. ábra.** Az  $\alpha\beta$ -peptid foldamerek által létrehozott H11 hélix (narancssárga) és H14/15 hélix (zöld) Röntgen szerkezetei. <sup>83</sup>

Az αβ-motívumra végzett *ab inito* kvantummechanikai számítások jól alátámasztották a hajlamukat H11 és H14/15 hélixek formálására.<sup>84-87</sup> Érdekes, hogy az erősen szerkezetindukáló (*S*,*S*)-ACHC monomerek nem vezettek hélixképződéshez ugyanilyen körülmények között az αβ mintázatban. A különféle oldalánctopológiákat vizsgálva a β-

aminosavmaradékokban kimutatták, hogy az ACPC egységeket nyíltláncú  $\beta^3$ -aminosavakra cserélve a hélix-képző hajlandóság csökkent, de bizonyos mértékben ezt a helyettesítést tolerálták a szekvenciák.<sup>88</sup> Az  $\alpha$ -aminosavak vonatkozásában az oldallánc  $\beta$ -elágazása szerkezetromboló hatású volt, ugyanakkor az  $\alpha, \alpha$ -diszubsztitúció (pl. Aib) a hélixképződést segítette. A lánchosszal a H14/15 hélix vált kedvezőbbé a nyújtottabb H11-hélix rovására a vizsgált tetramer-dekamer tartományon.<sup>83</sup> Egy ettől független tanulmányban a H14/15 hélixhez hasonló szerkezetet kaptak a ( $\beta^3$ -Aib)<sub>3</sub>- $\beta^3$  mintázatra, de a gerinc hiányzó H-kötéseket mutatott a feltehetően inherens flexibilitás miatt.<sup>89</sup> Az  $\alpha$ -aminosavakat kombinálták *cis* $\tau$ - $\beta$ -furanoid cukoraminosavakkal is és az alternáló szekvenciák szintén H11 és H14/15 hélixeket eredményeztek.<sup>90</sup> Az  $\alpha$ -aminosavmaradékok  $\beta$ -elágazásának hélix-gátló hatását kihasználva  $\alpha\beta$ -szekvenciákat állítottak elő, amelyek levegő/víz határfelületen redős szerkezet képeztek.<sup>91</sup>

#### 2.3.2 ααβ, βαα, αββ és βαβ motívumok

Egy aperiodikus undekapeptid (Boc-Val-Ala-Phe-Aib- $\beta^3h$ Val- $\beta^3h$ Phe-Aib-Val-Ala-Phe-Aib-OMe) alkalmat adott arra, hogy egy szekvencián belül megfigyeljék a szerkezetformáló sajátságokat a különböző motívumok környezetében.<sup>92</sup> A globális tekeredés helikális volt 13-tagú H-kötéses gyűrűvel a terminális részeken, 15-tagú gyűrűkkel az  $\alpha\beta\beta$ , valamint 14-tagú gyűrűkkel az  $\alpha\alpha\beta$  és  $\beta\alpha\alpha$  motívumoknál. Más aperiodikus  $\alpha,\beta$ -szekvenciáknál jellemzően kanyar-típusú másodlagos szerkezeteket regisztráltak.<sup>89,93,94</sup> Fontos és érdekes következtetéseket vontak le olyan kiméra foldamerek vizsgálatából, ahol a C-terminálison  $\beta$ -H14 hélixet konstruáltak (hexamertől dekamerig), az N-terminálison pedig egy  $\alpha$ -D-heptapeptid szegmens volt. Azt találták, hogy a relatíve rigid foldamer hélixnek nem volt strukturáló hatása a flexibilis  $\alpha$ -peptid szakaszra.<sup>95</sup>



**11. ábra.** Az  $\alpha\beta\beta$  (a) és az  $\alpha\alpha\beta$  (b) mintázatokra kapott Röntgen szerkezetek.<sup>96</sup>

Az  $\alpha\alpha\beta$  és az  $\alpha\beta\beta$  mintázatok hélix-indukáló hatását homokirális periodikus láncokban is vizsgálták.<sup>97</sup> Oldatfázisban a rövid oligomerek hexamerig kevert i – i+3 és i – i+4 eredetű NOE jeleket adtak, ugyanakkor a Röntgen szerkezet a nyújtottabb i – i+3 kölcsönhatásokkal stabilizált hélixeket mutatta ki (11. ábra).<sup>96</sup> Habár ezekben az esetekben is megnövekedett flexibilitást eredményezett az  $\alpha$ -aminosavak bevezetése a tiszta  $\beta$ -peptidekhez képest, de az oldallánc-kémia variálásához kiváló lehetőséget nyújtanak. Éppen ezért célkitűzésünk volt olyan foldamer hélixeket tervezni, amelyek úgy építik be az  $\alpha$ -aminosavakat, hogy a szerkezetalakító hajlam ezzel nem csökken.

### 2.3.3 $\alpha,\gamma$ -peptidek

A tiszta  $\beta$ -,  $\gamma$ - és az  $\alpha$ ,  $\beta$ -peptidekkel tapasztalt sikerek által hajtva illetve az elméleti számítások jóslásainak98 hatására γ-aminosavakkal kombináltak α-peptid láncokat és megvizsgálták az önrendeződési hajlamukat. Az alapvető konformációs építőelemeket gabapentin (Gpn) beépítésével igyekeztek felderíteni,99 mely esetben a foldamerekre jellemző intramolekuláris H-kötések megjelentek. A konkrét szekvenciától és a C-terminális védőcsoporttól függően megfigyeltek Gpn központú 7-tagú H-kötéses gyűrűket és i - i+2 kölcsönhatásból származó 9-tagúakat is. Egy másik konkrét láncban (Boc-Leu-Gpn-Leu-Aib-OMe) egy kevert 10- és 12-tagú gyűrűrendszer jelent meg az αγα motívumra.<sup>100</sup> Csakúgy, mint az α,β-szekvenciáknál, a konformációs polimorfizmus az α,γ-láncoknál is fontos szerepet játszik.<sup>101</sup> A Boc-Aib-Gpn-Aib-Gpn-NHMe tetramer három különböző kristályos módosulatot mutatott a Röntgen vizsgálatoknál. Az egyikben két egymást követő 12-tagú gyűrűt találtak az N-terminálisnál és egy addig ismeretlen 17-tagú H-kötéssel stabilizált γαγ kanyart a C-terminálisnál. A másik két módosulat szeparált 9-tagú és 7-tagú H-kötéses gyűrűket alakított ki. A gerinchez kondenzált ciklusos oldalláncok ezekben a szekvenciákban is nagy szerepet játszanak. Olyan γ-aminosavat építettek αγ-mintázatba D-α-aminosavakkal, amelyekben cisz-(R,R)-y<sup>3,4</sup>-ciklohexil és egy változó (R)-y<sup>2</sup>-oldallánc épült a gerinchez.<sup>102</sup> A tetramerek és a hexamerek is ay-H12 hélixeket alkottak.

### 2.3.4 $\beta$ , $\gamma$ -peptidek

Külön érdeklődés mutatkozik a βγ-motívum iránt, mert ez a dipeptid szakasz ugyanannyi atomot tartalmaz az N- és C-terminálisok között, mint egy α-tripeptid. Sztereokémiailag homogén  $\beta^3$ - and  $\gamma^4$ -szubsztituensekkel (D-xilóz C-kapcsolt karbo- $\beta$ - and  $\gamma$ -aminosavai)  $\beta\gamma$ -peptideket állítottak elő.<sup>103</sup> Az oldatfázisú szerkezetmeghatározást egyetlen i - i+2 NOE kölcsönhatásra alapozták mind a tetramer, mind a hexamer esetén ami, H11/13 hélix jelenlétére utalt. Valószínű, hogy a szerkezeti hipotézis további finomítást igényelne tekintve, hogy más szerkezeti paraméterek is igen nagy flexibilitásra utaltak. Újabb  $\beta\gamma$ -szekvenciákat is előállítottak, melyeknél  $\gamma^{3,4}$ -ciklohexil oldalláncokkal (2-(2-aminociklohexil)butánsav) tették merevebbé a gerincet és ezeket *trans* $\chi$ -ACPC-vel kombinálták illeszkedő abszolút konfigurációval.<sup>104</sup> Az így jelentősen megkötött gerinc a  $\beta\gamma$ -H13 hélixet adta eredményül (12. ábra).



**12. ábra.** A βγ-H13 hélix oldal- (a) és felülnézetben (b).

#### 2.4 Sztereokémiai kontroll

A biomolekulák felépítésében néhány kivételtől eltekintve csak egyetlen enantiomer vesz részt, ugyanis fehérjéket csak L-a-aminosavak alkotják. Ezt a jelenséget hívjuk biológiai homokiralitásnak.<sup>105</sup> Mivel a tükörképi párok valamennyi akirális közegben vizsgált fizikai és kémiai tulajdonsága megegyezik, a biológai homokiralitás nem magától értetődő jelenség. Már Louis Pasteur megfogalmazta, hogy az enantiomerek feldúsulása az élet jelenlétéről tanúskodik. Nagyon valószínű, hogy a homokiralitás és az élet eredetét közös ponton kell keresnünk, és bár több hipotézist találhatunk erre vonatkozóan az irodalomban,106,107 konszenzusra vezető elmélet jelenleg sincs. A szerkezeti vonatkozásokat tekintve tudjuk, hogy az önrendeződésnek nem előfeltétele a homokiralitás. Az antibiotikus hatással rendelkező gramicidinnek alternáló D- és L-α-aminosav szekvenciája van, és így alakítja ki a nagy átmérőjű β-hélixet a membrán apoláris közegében.<sup>51</sup> Szintetikusan előállított szekvenciák segítségével felismerték, hogy a sztereokémia jó eszközt ad a kezünkbe az α-peptid láncok geometriájának szabályozására, beleértve a β-kanyarok kialakítását, hélixmotívum lezárását és az alternáló DLmintázat alkalmazását.<sup>108</sup> Továbbá az α-peptid láncok kompakt feltekeredését is befolyásolni tudták racionálisan tervezett sztereokémiai mintázat segítségével.<sup>109-112</sup> A β-peptidek vonatkozásában már a korai megfigyelések is arra utaltak, hogy a gerinc térkémiája szoros kapcsolatban áll a szerkezetformáló hajlammal.60 A sztereokémiai szabályzás általános törvényszerűségeinek felderítése és alkalmazása munkánk fontos célkitűzése volt.

### 2.5 Foldamerek tercier/kvaterner szerkezete és nanostrukturált rendszerek

#### 2.5.1 Hélixkötegek egységenként történő tervezésével

Magasabbrendű foldamer struktúrák létrehozása jelenleg is nagy kihívás, sikereket csak az elmúlt néhány évben értek el. Korai megfigyelések saját munkáinkkal együt azt mutatták, hogy az amfifil foldamer hélixek szolvofób kölcsönhatások által hajtva önasszociálódnak.<sup>113</sup> Harmadlagos szerkezeti modell létrehozására irányuló kísérletben kettő amfifil β-H14 hélixet kötöttek össze diszulfid híddal és kooperativ feltekeredésre utaló jeleket találtak hőmérsékletfüggő ECD segítségével.<sup>114</sup> Nukleobázisok közötti felismerést<sup>115</sup> és irányított kristály-

növesztési technikákat<sup>116</sup> is bevetettek magasabbrendű szerkezetek létrehozására β-peptid hélixekből.



**13.** ábra. β-H14 hélixekből felépülő oktamer hélix-köteg.<sup>117</sup>

Az önasszociációra irányuló fő hajtóerőt az apoláros oldalláncok közötti hidrofób kölcsönhatások adják, amely elvet már jól ismerhetünk a protein-tervezés sarokköveként. Azonban a specifikus asszociációt, ami a jól definiált tercier és kvaterner szerkezetek jellemzője, további elektrosztatikus kölcsönhatásokkal irányíthatjuk. Ezt a megközelítést követték, amikor egy dodekamer β-H14 hélix első és tizedik aminosav egységét savas illetve bázikus oldalláncokkal építették be úgy, hogy azok egy hidrofób felszín peremén helyezkedjenek el.<sup>118</sup> A hidrofób felszínt négy hβ<sup>3</sup>-leucin és kettő hβ<sup>3</sup>-fenilalanin alakította ki. A hőmérséklet- és koncentráció-függő ECD mérések igazolták a savas és a bázisos oldalláncokkal kilalakított hélixek közötti preferenciális kötődést. Továbbá a másodlagos szerkezetek hélix-tartalma jelentősen megnövekedett a tiszta savas és bázisos hélixekhez képest. Így a heterodimer kooperatív olvadási jelenséget mutatott.

Ezt a tervezési elvet kiterjesztették önmagával komplementer ikerionos szerkezetekre, hogy az önasszociációt is megvalósítsák. Eredményül specifikus asszociációt kaptak egy oktamer hélixköteg formájában, és a foldamerek körében első vízoldékony kvaterner szerkezetet analitikai ultracentrifuga és Röntgen vizsgálattal igazolták (13. ábra).<sup>117</sup> A kiindulási hélixek módosításával a hélixköteg stabilitását tovább növelték,<sup>119,120</sup> és azt találták, hogy a termodinamikai paraméterek tekintetében a rendszer a természetes proteinekhez nagyon hasonlóan viselkedik.<sup>121</sup>



**14. ábra.** A GCN4-pLI peptid alapján létrehozott tetramer hélixköteg  $\alpha_3\beta\alpha_2\beta$  mintázattal.<sup>122</sup>

### 2.5.2 Hélixkötegek ismert proteinekből kiindulva

Ennél a tervezési megközelítésnél egy már jól jellemzett  $\alpha$ -peptidet használtak kiindulópontként, aminek a másodlagos és kvaterner szerkezetét ismerik: GCN4-p1, ami egy 33 aminosavas szegmense a GCN4 proteinnek.<sup>123</sup> Ez egy leucin zipzár és dimer, parallel hélixköteg (*coiled coil*) kvaterner szerkezetet ad oldat és szilárd fázisban egyaránt. A hidrofil és a hidrofób aminosavakat egy heptád templátra helyezték el, és az  $\alpha$ -aminosavakat szisztematikusan  $\beta^3$ -aminosavakra cserélték a hidrofil oldalon. Ez egy  $\alpha_3\beta\alpha_2\beta$  gerinc mintázathoz vezetett az eredeti oldallánckémiával.<sup>124</sup> A kapott peptid nem mutatott önasszociációt oldatfázisban a 100-200 µM koncentráció tartományban sem, de parallel trimer hélixköteget hozott létre kristályszerkezetben. A hidrofób felületet módosítva Leu és Ile aminosavakkal (jelentősen megnövekedett a hidrofobicitás a GCN4-pLI alapján<sup>125</sup>) specifikus oldatfázisú asszociációhoz jutottak egy tetramer hélixköteg formájában (14. ábra).<sup>122</sup> Az  $\alpha$  ->  $\beta^3$  helyettesítést a hidrofób oldalon is elvégezték és a tetramer hélixköteg oldatfázisú képződését itt is megfigyelték.

Egy további tetramer hélixköteget kialakító  $\alpha$ -peptid sablon volt az Acid-pLL/BasepLL.<sup>126</sup> Ebben minden második aminosavat  $\beta$ -aminosavra cseréltek, így jutottak  $\alpha\beta$ motívumhoz.<sup>127</sup> Mivel a homokirális  $\alpha\beta$  típusú szekvenciák ciklusos oldalláncú  $\beta$ aminosavakat igényelnek a H14/15 hélix kialakításához, *transz*-ACPC és *transz*-APC építőelemeket használtak az elsődleges szerkezetben. A tisztán  $\alpha$ -peptid Acid-pLL és az  $\alpha\beta$ peptid Base-pLL származék kooperatívan feltekeredett és 2:2 heterotetramert alakított ki. Ez bizonyítékul szolgált arra, hogy különböző gerincmintázattal rendelkező oligomerek között is kialakulhat kölcsönhatás és diszkrét heterogén kvaterner szerkezet. Nemrégiben gerinc tioészter kicserélődést javasoltak, hogy teszteljék a preferenciális harmadlagos szerkezeti kontaktusokat foldamer és természetes  $\alpha$ -peptid hélixek között.<sup>128</sup>

#### 2.5.3 Nanostrukturált rendszerek

A különálló vízoldékony hélixkötegek létrehozása sikerrel kecsegtetett β- és α,β-peptid szekvenciák esetén. Azonban ugyanilyen redős rétegek megépítése sokkal nehezebb feladat a távolható hidrofób kölcsönhatások programozásának nehézségei miatt. Habár különálló β-hordó mimetikumokat elméletileg elő lehet állítani β-peptidekből,<sup>129-131</sup> amint a szál-szerű építőelemek poláris oldószerbe kerülnek, de a hidrofób kölcsönhatások végtelen redős rétegekből álló fibrillumok irányába terelik a rendszert. Ez megelőzhető azzal, ha ciklusos peptideket alkalmazunk,<sup>132</sup> vagy az önasszociációt víz/levegő határfelületen figyeljük meg.<sup>91</sup> Habár ez a fajta fibrillum képződés igen káros a természetes proteinek esetén, a foldamerek körében egy kiváló módszert nyújt a láncok redőzött réteg formálási képességének ellenőrzésére. Ezt a jelenséget elsőként mutattuk ki a foldamerek körében és ezt követve azután újabb rendszereket írtak le. (1*R*,2*S*)-ACBC homotetramerjeinek segítségével képeztek fibrillumokat<sup>58,59</sup> és ezeket funkcionalizálva elektromosan vezető nanostrukturált rendszereket is találtak.<sup>57</sup> Ugyanezt a jelenséget figyelték meg a heterociklusos építőelemet is tartalmazó Boc-(L-β<sup>3</sup>-hPhe-D-Oxd)<sub>2</sub>-Obn láncnál, amivel antiparallel β-redő mimetikumot hoztak létre.<sup>22</sup>

#### 2.6 Biológiai alkalmazások

Nagyon fontos aspektusa a foldamerek kutatásának, hogy a szerkezeti tulajdonságokkal együtt a biomolekulák funkcióját is képesek legyünk utánozni különös tekintettel a biológiai rendszerekkel való kölcsönhatásokra. A protein-protein kölcsönhatások, a kismolekulákkal nem támadható célpontok és a protein hatóanyagoknál fellépő farmakokinetikai problémák mind új paradigmát igényelnek. Ezeket a kérdéseket reményeink szerint foldamerek segítségével sikeresen lehetne megcélozni, mert ellenállnak a hidrolázok lebontó hatásának és hangolható farmakokinetikát mutatnak.<sup>4,11,133-135</sup> Emellett a kémiai eszközökkel előállított szerkezetük ellenőrizhetővé és egységessé teszi őket, így igen nagy kihívást jelentenek a mai protein terapeutikumok esetén.

A foldamerek a temészetes proteinekhez hasonlatos változatosságot mutatnak és a viszonylag könnyen hangolható geometriájuk, illetve molekula felszínük alkalmassá teheti őket nehéz biomolekuláris célpontok felismerésére és működésük befolyásolására. A következő esetekben már kimuttaták az alkalmazhatóságot: szomatosztatin receptor<sup>136</sup> és az integrin α<sub>IIb</sub> receptor transzmembrán regiója<sup>137</sup>, a p53-hDM2<sup>138-144</sup> és a BH3-Bcl-x<sub>L</sub><sup>145-148</sup> protein kölcsönhatások, a gp41 HIV vírus sejt infúziós protein komplex,<sup>149-152</sup> lektinek,<sup>153</sup> protein-RNS kölcsönhatások,<sup>154</sup> és a γ-szekretáz enzim.<sup>155</sup> Emellett kimutatták még tervezett, sejtmembránnal kölcsönható foldamerek antibiotikus hatását.<sup>75,156-158</sup> E dolgozat terjedelme nem teszik lehetővé, hogy valamennyi eddigi biológiai alkalmazás hátterét elemezzem, így a továbbiakban a protein-protein kölcsönhatások gátlásának területén elért eredmények szerkezeti aspektusait tekintem át.



**15. ábra.** A p53-hDM2 kölcsönhatás gátlása  $\beta$ -peptid (a) és aromás oligoamid (b) hélix mimetikumokkal.

Az eddigi foldamer-alapú protein-protein kölcsönhatás inhibitoroknak fontos közös jellemzőjük, hogy a tervezésük ismert szerkezetű hélix interfészek utánzása alapján történt. Az egyik ilyen jól ismert rendszer a p53 tumorszupresszor és a hDM2 onkoprotein kölcsönhatás, amit két kutatócsoport is célbavett foldamerek segítségével. A p53 fontos szerepet játszik a rákos útra térő sejtek apoptózisának beindításában és a hDM2 negatív regulációt fejt ki a p53-ra, amely kölcsönhatásnak a szétkapcsolása fontos célkitűzés.<sup>159</sup> A p53 aktivációs doménje egy  $\alpha$ -hélixen keresztül képes kötődni a hDM2 onkoproteinhez. A fentebb részletesen elemzett  $\beta$ -H14 hélix geometriát alkalmazva kiépítettek a p53 hDM2 kötő epitópját mintázó izosztér hélixeket és sikeres inhibíciót értek el vele (15a. ábra).<sup>138-142,160</sup> Aromás oligoamid foldamerekkel is sikeresen valósították meg a gátlást (15b. ábra).<sup>143,144</sup>



**16. ábra.** A HIV gp41 fehérje (szürke) komplexe az  $\alpha$ -peptid inhibitorral (sárga, baloldal) és az áttervezett  $\alpha$ , $\beta$ -peptid foldamer inhibitorral (színkódolt, jobbra).

A Bcl-x<sub>L</sub> antiapoptotikus fehérje túlexpresszálódását számos tumoros sejtben megfigyelték, és ismert, hogy ennek a funkcióját a proapoptotikus Bak vagy Bad faktorok regulálják. A Bcl-x<sub>L</sub> a regulátorok BH3 doménjén keresztül kapcsolódik. Ennek a szerkezeti hipotézisnek segítségével terveztek  $\beta$ - és  $\alpha$ , $\beta$ -peptid foldamer hélixeket, amelyek Bcl-x<sub>L</sub> antagonistaként tudtak működni.<sup>145-148</sup>

A HIV gp41 proteinje a gazdasejtbe való bejutást segti elő, a protein hélixkötegeinek specifikus elrendeződése fontos szerepet játszik a mechanizmusban. A gp41 működését sikeresen gátolták a hélixkötegbe beépülő  $\alpha$ , $\beta$ -peptid foldamer hélix mimetikumokkal (16. ábra).<sup>149-152</sup> A tervezés itt is ismert  $\alpha$ -peptid inhibitorból indult ki és a szerkezeti információknak megfelelően az első lépcsőben  $\alpha$ -> $\beta$  helyettesítéseket hajtottak végre, majd ciklusos  $\beta$ -aminosavak beépítésével merevítéseket vezettek be az affinitás javítására.

### 3 Módszerek

### 3.1 Peptidszintézis

A védett nyíltláncú β3-aminosav monomereket kereskedelmi forgalomban kapható (GL Biochem, Sigma-Aldrich) termékként szereztük be. Az enantiomertiszta védett ciklusos oldalláncú β-aminosavakat az SZTE Gyógyszerkémiai Intézet munkatársai biztosították számunkra. A peptid foldamerek szilárd hordozón Boc vagy Fmoc technikával készültek. A Boc technikához 4-metilbenzhidrilamin (MBHA) gyantát alkalmaztunk, melynek a borítottsága 0,63 mmol/g volt. A szintézisek manuálisan történtek 0,25 mmol méretben. A kapcsolásokat 3 ekvivalens diciklohexilkarbodiimid (DCC) és hidroxibenzotriazol (HOBT) alkalmazásával végeztük, az oldószer diklórmetán (DCM) és a reakcióidő 3 óra volt. A sztérikusan gátolt, hidrofób ACHC monomerek esetén a harmadik aminosav beépítése után a kapcsolási hatékonyság jelentősen romlott. Ezt javítani tetrametilfluorformamidiniumhexafluorfoszfát (TFFH) aminosav-fluorid képző kapcsolószer segítségével tudtuk. A kapcsolási lépések után a gyantát háromszor DCM-nal és egyszer metanollal és végül megint DCM-nal mostuk. Az aminosavak beépülését a ninhidrin-teszttel, esetenként a gyantáról való próbahasítással és LC-MS-sel vizsgáltuk. A Boc védőcsoportot 50 % trifluorecetsav (TFA) DCM oldattal távolítottuk el két lépésben 20 illetve 15 perces reakcióidőkkel. A gyantát a leírt módon mostuk és 10 %-os trietilamin DCM oldattal semlegesítettük. A gyantáról való hasítást folyékony hidrogén-fluorid (HF)/dimetilszulfid/pkrezol/p-tiokrezol (86:6:4:2, v/v) elegyével végeztük 0 °C-on 1 órán át. A HF-ot eltávolítottuk és a szabad peptidet száraz, hideg dietiléterrel csaptuk ki. A csapadékot szűrtük, mostuk és 10 %-os vizes ecetsav oldatban feloldottuk, majd liofilizáltuk. A nyers terméket fordított fázisú HPLC segítségével tisztítottuk, a kromatográfiáshoz Nucleosil C18 7 µm 100 Å (16 mm x 250 mm) oszlopot használtunk Knauer készülékben. Az oldószer-rendszer a következő volt: 0,1 % TFA vízben; 0,1 % TFA és 80% acetonitril vízben. Lineáris gradienst használtunk 60 percig 3,5 mL min-1 áramlási sebesség mellett, a detektálás 206 nm-en történt. A frakciók tisztaságát Agilent 1100 HPLC segítségével vizsgáltuk, Phenomenex Luna C18 100 Å 5 µm (4,6 mm x 250 mm) oszloppal. A tiszta frakciókat összegyűjtöttük és liofilizáltuk. A tisztított terméket tömegspektrométerrel karakterizáltuk (Finnigan TSQ 7000 tandem kvadrupol, elektrospray ionforrással).

Az Fmoc kémiával történő szintéziseket TentaGel R RAM gyantán végeztük (0,19 mmol/g), a Rink-amid csatoló elem peptid-amidokat eredményezett. Ez az eljárás jellemzően tisztább nyersterméket és jobb termelést adott. Manuálisan, 0,1 mmol skálán dolgoztunk. A kapcsolásokat két lépésben hajtottuk végre. Először 3 ekvivalens Fmoc védett aminosavat, 3 ekvivalens urónium típusú kapcsolószert (O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-

tetrametilurónium hexafluorfoszfát, HATU) és 6 ekvivalens N,N-diizopropiletilamint (DIPEA) oldottunk N,N-dimetilformamidban (DMF) és az elegyet 3 órán át rázattuk. A második lépésben 1 ekvivalens védett aminosavat, 1 ekvivalens HATU-t és 2 ekvivalens DIPEA-t alkalmaztunk. A kapcsolási lépések után a gyantát háromszor mostuk DMF-dal, egyszer metanollal és háromszor DCM-nal. A deprotektálást két lépésben 2 % 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-énnel (DBU) és 2 % piperidinnel végeztük DMF oldatban, 5 és 15 perces reakcióidőkkel. A gyantát a fent leírtak szerint mostuk. A hasítást TFA/víz/DL-ditiotreitol/triizopropilszilán (90/5/2,5/2,5) eleggyel 0 °C-on egy órán át végeztük. A tisztítás egy JASCO HPLC segítségével Phenomenex Luna C18 100 Å 10 μm (10 mm x 250 mm) oszlopon történt, esetenként Phenomenex C4 oszlopot használtunk. Az oldószer rendszer a következő volt: 0,1 % TFA vízben; 0,1 % TFA és 80 % acetonitril vízben. Lineáris gradienst használtunk 60 percig 4 mL min<sup>-1</sup> áramlási sebesség mellett, a detektálás 206 nm-en történt. A tiszta frakciókat HPLC-vel és MS-rel ellenőriztük a fent leírt módon egy Agilent 1100 LC-MSD készülékkel.

### 3.2 Szerkezetvizsgálatok

#### 3.2.1 NMR spektroszkópia

Az NMR méréseket Bruker Avance DRX 400 és 500 (multinukleáris próbafej, zgradienssel), valamint AVII 600 Mhz-es (1H, 13C, 15N triplarezonancia kriohűtött próbafej, zgradienssel) készülékeken végeztük, az oldószer deutérium jelére lock-olva. A peptid foldamereket széles koncentráció tartományban vizsgáltuk az önasszociációs hajlamtól és a vizsgálni kívánt jelenségtől függően (0,1 – 8 mM). A méréseket az optimális jelfeloldottságot adó és az adott oldószernek megfelelő hőmérsékleten végeztük (283-310 K). Az oldószerek a következők voltak: CD<sub>3</sub>OD, CD<sub>3</sub>OH, DMSO- $d_6$  és víz (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1). А jelhozzárendeléseket 2D mérések kombinációjával végeztük el: TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY), ROESY (Rotating frame Overhauser Effect SpectroscpoY) és NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY). A detektált pontok számát az F1 és F2 dimenzióban a mérési technikákhoz és a szükséges digitális felbontáshoz igazítottuk. Tipikus értékek: 16 - 64 scan, 1k - 2k mérési pont az idő koordinátán és 256 - 1024 inkrementum a közvetetten detektált dimenzióban. A TOCSY mérésekhez az MLEV17 keverési pulzusszekvenciát használtuk 80 ms keverési idővel. A NOESY és a ROESY méréseknél a keverési időt 200 - 400 ms tartományon állítottuk, a spin diffúzió hiányáról kontroll kísérletekben meggyőződtünk. A ROESY esetében kapott keresztcsúcs intenzitásokat az offrezonancia hatásnak megfelelően korrigáltuk. A kiértékeléshez Xwinnmr és Topspin szoftvereket használtuk.

#### 3.2.2 Elektronikus cirkuláris dikroizmus

Az elektronikus cirkuláris dikroizmus méréseket Jobin-Yvon Mark VI vagy Jasco J815 dikrográfokon végeztük szobahőmérsékleten, 0,02 cm-es küvettában. Az alacsony hullámhossz tartományban zavaró elnyelése miatt DMSO-t nem használtunk, a mérések metanolban és vízben történtek. Egy mérés során jellemzően 10 spektrumot akkumuláltunk. A koncentrációk megfeleltek az NMR szerkezet és részecskeméret meghatározási módszereknél alkalmazottaknak. A koncentráció-függő ECD méréseknél a konkrét értékeket megadjuk. A kiértékelésnél koncentrációra és a kromofórok számára normalizáltuk az intenzitásokat. Az adatokat moláris ellipticitásban  $[\Theta]$ , deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>, vagy cirkuláris dikroizmusban  $\Delta \epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> adjuk meg. A peptid foldamerek ECD eredményeinek értékelésénél ki kell emelnünk, hogy a görbék lefutása meglehetősen változatos lehet. A másodlagos szerkezet típusa mellett nagy hatással van rájuk a konkrét építőelemek szerkezete (ciklusos vagy aciklusos) és a rövid szekvenciáknál a terminális elem flexibilitása is. Kimutatták ugyanis, hogy azonos globális tekeredés mellett kis geometriai változás is erősen befolyásolja a Cotton effektus intenzitását és hullámhosszát.<sup>161,162</sup> Azt is megfigyelték, hogy a hélixek önasszociációja a Cotton effektusban kékeltolódást okoz.163 Mindezzel együtt (i) egy vegyületsorozaton belül, (ii) vagy azonos szerkezetek de különböző oldószerek között, (ii) vagy azonos konstitúció mellett de különböző sztereokémiai mintázatoknál biztonsággal vonhatunk le következtetéseket a szerkezetek változásáról kvalitatív módon. Az ismeretek jelenlegi állása szerint azonban kerülnünk kell, hogy az ECD görbékből azonnal különbséget tegyünk a hélixek típusa között vagy akár a rendezettség mértékére utaló kvantitatív elemzést végezzünk.

#### 3.2.3 Infravörös színképek és vibrációs cirkuláris dikroizmus

Az infravörös méréseket Bio-Rad Digilab Division FTS 65A/869 FT-IR spektrométerrel végeztük. A mintákat metanolban oldottuk fel. A méréseket 4000-400 cm<sup>-1</sup> spektrális tartományon, 4 cm<sup>-1</sup> optikai felbontással és 256 scan-nel mértük. A detektor deuterált triglicil-szulfát volt, a mintát egy 0,1 mm úthosszú folyadékcellában helyeztük el és KBr<sub>2</sub> ablakokat használtunk.

A vibrációs cirkuláris dikroizmus mérések az Eötvös Loránd Tudományegyetem Kémiai Intézet Kiroptikai Laboratóriumában (Prof. Hollósi Miklós és Dr. Vass Elemér) történtek Bruker Equinox 55 FTIR-hez csatlakoztatott PMA 37 VCD/PM-IRRAS modulon. A ZnSe fotoelasztikus modulátor 1600 cm<sup>-1</sup> értékre volt állítva és egy 1960-1250 cm<sup>-1</sup> tartományon működő szűrőt alkalmaztak a karbonil-régió érzékenységének javítására. A mérésekhez egy 0,207 mm úthosszú CaF<sub>2</sub> cellát alkalmaztak, a minta koncentrációja 10 mg/ml volt. A méréseket 21000 pásztázás átlagaként kaptuk, ami 6 h mérési időnek felel meg. Az oldószerre kapott spektrummal korrigáltunk. Az elméleti VCD spektrumot *ab initio* B3LYP/6-311 G\*\* szinten számítottuk és a kísérleti görbéket ezekkel vetettük össze.

### 3.3 Részecskeméret és morfológia

### 3.3.1 Diffúziós gradiens ekho NMR spektrumok (DOSY)

A DOSY (PFGSE) NMR méréseket stimulált ekho és longitudinális maradék örvényáram lecsengéses (LED) pulzus szekvenciával végeztük és oldószer elnyomást alkalmaztunk. A defázisoló/refókuszáló gradiens pulzus 2 ms volt, a diffúziós késleltetés pedig 250 ms. A gradiens erősségét négyzetes menet szerint 16 lépésben állítottuk 5 %-ról indulva, 60 – 95 % maximális értékig egy B-AFPA 10 A gradiens erősítőn. A diffúziós mérések alatt a hőmérséklet ingadozás 0,1 K alatt maradt, a termikus egyensúlyt 30 percen át hagytuk beállni a mintatérben. A kiértékelést a lecsengési görbe linearizálásával és regresszióval végeztük. Az aggregációs szám számításánál a Stokes-Einstein egyenletet használtuk a szerkezetfinomítási lépésben kapott geometriák és alkalmasan válaszott külső térfogati referencia felhasználásával.

### 3.3.2 Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A TEM mérések az SZTE Orvosvegytani Intézet közreműködésével (Dr. Fülöp Lívia) történtek. A 10 μl-es minta cseppeket karbon-formvarral borított rézháló (400 mesh) mintatartóra helyeztük (Electron Microscopy Sciences, Washington DC, USA). A kitapadt aggregátumokat utána 0,5 % (v/v) glutáraldehid oldattal fixáltuk egy percig, háromszor mostuk desztilállt vízzel és 2 % (w/v) uranil acetát oldattal megfestettük két percig, majd a mintát megszárítottuk. A mintákat egy Philips CM 10 transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA) 100 kV-on. A képeket Megaview II Soft Imaging System programmal rögzítettük 25000x, 46000x és 64000x nagyításoknál és AnalySis® 3.2 szoftver csomaggal (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany) analizáltuk.

### 3.3.3 Dinamikus fényszórás (DLS)

A mintákat öt perc ultrahangos kezelés után sterilszűrőn (PVDF membrán pórus méret 100 nm, Millipore, Billerica, MA, USA) keresztül vittük a küvettába. A méréseket 25 °C-on végeztük egy Malvern Zetasizer Nano ZS műszeren (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK), ami egy He-Ne (633 nm) lézerrel van felszerelve. A mérés a "Non-Invasive Back Scatter" (NIBS<sup>®</sup>) technológiával történt, ami 173° szögben méri a szórt fény időbeli változását. Az autokorrelációs függvényt 3x14 mérésből határoztuk meg, és a transzlációs diffúziós koefficienst ebből határoztuk meg a CONTIN algoritmus alkalmazásával. A kiértékeléshez Dispersion Technology Software 5.1 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) programot használtunk. A méreteloszlási görbét a diffúziós koefficiensekből szférikus közelítéssel számított látszólagos hidrodinamikai átmérőre adtuk meg.

### 3.4 Molekulamodellezés és szerkezetfinomítás

#### 3.4.1 Szerkezetfinomítás molekuláris mechanikai szinten

A számításokat a CDiscover vagy a Molecular Operating Environment (MOE) szoftverrel végeztük. A molekuláris erőtér modellek rendre a CVFF és az MMFF94x164,165 voltak. A kezdeti modellek kialakításánál 15 Å határt szabtunk a van der Waals és Coulomb kölcsönhatások számításának, a végső számításokban ezt a korlátozást kikapcsoltuk. A közeget távolság-függő dielektromos állandó (er) segítségével vettük figyelembe, vagy implicit oldószer modellt alkalmaztunk. A számításokat a metanol, illetve víz dielektromos állandójával végeztük. A konformációs mintavételezést vagy szimulált hűtés (SA) eljárással vagy hibrid Monte Carlo (MC) - molekula dinamika (MD) szimulációval (a MOE-ban implementált módon) hajtottuk végre 300 K-en. Az SA módszerben 1000 random struktúrát generáltunk 1000 K-en, 100 ps-os dinamikában, a szerkezeteket 1000 lépésenként mentve. Majd ezeket 25 ps alatt lehűtöttük exponenciális hőmérséklet profillal és kényszerfeltételekkel, a végén minimalizáltunk. Az MC-MD esetén minden 10 MD lépés után egy véletlen MC lépés történt. Az MC-MD számítást 2 fs lépésközzel 20 ns hosszan futattunk és a konformációkat 1000 MD lépésenként mentettük, ami így 104 szerkezetet eredményezett. Az NMR kényszerfeltételekkel végzett számításoknál a felső távolsági megkötéseket az izolált spinpár becsültük offszet-kompenzált ROESY integrálokból. közelítéssel az А felső kényszerfeltételeket három osztályba soroltuk: erős (2,5 Å), közepes (3,5 Å), gyenge (5 Å), az alsó kényszerfeltételt 1,8 Å-re állítottuk. A távolsági kényszerfeltételeket csonkolt négyzetes büntetőfüggvényekként alkalmaztuk úgy, hogy csak a távolsági határokon kívül kapcsoltuk be 5 kcal mol-1 Å-2 erőálladóval. A végső konformációkat minimalizáltuk 0,05 kcal mol-1 gradiensig, és a számítást kaszkádolva végeztük: legnagyobb meredekség, konjugált gradiens és csonkolt Newton algoritmusokkal.

#### 3.4.2 Ab inito kvantummechanikai szerkezeti optimalizálások

Az *ab inito* kvantummechanikai számításokat a Gaussian 03 és 09 programcsomagokkal hajtottuk végre. A kiindulási térszerkezeteket z-mátrix formájában definiáltuk a GaussView program segítségével. A szerkezeti optimalizálásokat két lépésben végeztük: először egy közelítést alkalmaztunk RHF/3-21G szinten, utána a B3LYP/6-311G\*\* szintet használtuk a végső geometria és energia kiszámítására. A vizsgálataink kezdetén a geometriát csak RHF/3-21G elméleti szinten számítottuk és az energiát a B3LYP/6-311G\*\* módszerrel, de erről az alacsonyabb szintről is kimutatták, hogy kielégítő leírását adja a β-peptid foldamerek viselkedésének.<sup>44</sup> Esetenként az oldószer figyelembe vételére implicit oldószermodellt használtunk (polarizálható kontinuum model, PCM).<sup>166</sup>

### 4 Eredmények és diszkusszió

#### 4.1 Foldamerek térszerkezetének sztereokémiai szabályzása

#### 4.1.1 Szabályok megállapítása, elvi megfontolások [1-3]

Ebben a fejezetben azokat az eredményeket mutatom be, amelyek az alifás foldamerek periodikus másodlagos szerkezeteinek (hélix és szál) kialakulását és annak törvényszerűségeit a gerinc sztereokémiai mintázatának szemszögéből vizsgálja. A tárgyalásmód nem időrendet követ, először az általunk később közölt általánosítható elvi megfontolások és megfigyelések szerepelnek, amelyek azután a többi kísérleti eredményünket is rendszerbe állítják.

A sztereokémiai konfiguráció a hatását a gerinc globális geometriájára a lokális torziókon keresztül fejti ki és ezt a jelenséget az α-peptid láncokra talán legszemléletesebben a Ramachandran térkép megengedett és tiltott q, v régiói ragadják meg. Ezt tömören úgy foglalhatjuk össze, hogy az L-α-aminosav konfiguráció a φ torziót negatív tartományokba kényszeríti, ugyanakkor a D- $\alpha$ -aminosavak a  $\varphi > 0$  orientációt részesítik előnyben. Ugyanakkor a \u03c6 diéderes szög előjele változó marad, és más, nem lokális tényezők befolyásolják (pl. szolvofób hatások és oldallánc kölcsönhatások). Így maradhat az α-peptid lánc flexibilis, és vehet fel egyazon sztereokémiával lényegesen különböző periodikus szerkezeteket. A homológok, mint a β- és γ-peptidek sztereokémiai szempontból valószínűleg abban különböznek leginkább a természetes  $\alpha$ -peptidektől, hogy a  $\varphi$  és  $\psi$  torziókat legalább egy kovalens kötés elválasztja, így mindkét torzióra különböző aszimmetria centrum hathat. A peptidkötések egymáshoz való közelsége nem rontja le hatásukat. Ennek az lesz az gerinc sztereokémiai konfigurációi eredménye, hogy а közvetlenül, lokálisan meghatározhatják két fontos torzió ( $\varphi, \psi$ ) orientációját, az egyéb hatásoktól kevésbé függően. Az nyilvánvaló, hogy a közbeeső gerinctorzióknak (0n) szintén alkalmazkodniuk kell a másodlagos szerkezet görbületéhez, pl. csak gauche szögek alakítanak ki hélixet a β-peptidek esetén, de szál is kialakulhat gauche szögekkel. Továbbá ezeket is befolyásolhatja a sztereokémiai mintázat, ha flexibilisek. Azonban most fókuszáljunk a φ és ψ torziókra és vizsgáljuk meg az irodalomban eddig összegyűlt adatokat (1. táblázat és 17. ábra), hogy a gerinc sztereokémiai konfigurációi milyen torziók kialakulását segítik elő β- és γaminosavmaradékok esetén.

**1. táblázat.** Az ismert  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -aminosavakból felépített periodikus másodlagos szerkezetek jellemző  $\varphi$  és  $\psi$  értékei és a vonatkozó abszolút konfigurációk. A szürkével kiemelt sorok általunk két *de novo* tervezett hélixet jelölnek.

	Ismétlődő egység	Másodlagos szerkezet	[ <b>φ,ψ]</b> ismétlődő motívum	Abszolút konfigurációk <sup>c</sup>	Periodicitás <sup>d</sup>
			fokban <sup>b</sup>		
1	α	α-hélix <sup>167</sup>	[-65,-39] <sup>α</sup>	$[S]^{\alpha}$	4
2	α	$3_{10}$ -hélix <sup>167</sup>	[-50,-25] <sup>α</sup>	$[S]^{\alpha}$	3
3	α	$\pi$ -hélix <sup>167</sup>	[-45,-80] <sup>α</sup>	$[S]^{\alpha}$	5
4	α	β-hélix <sup>51</sup>	[-153,144]∝[125,-124]∝	$[S]^{\alpha}[R]^{\alpha}$	6
5	β	H14-hélix <sup>38,45,117,168,169</sup>	[138 <b>,</b> 135] <sup>β</sup>	$[RR]^{\beta}$	3
6	ß	<b>L12</b> bálim 38.52.170	Γ 02 1051β		2
0	p	H10 bály 46	[-92,-105] <sup>r</sup>	נסטן נסטו	2
0	p	LIQ hálim53	[09,03] <sup>6</sup>	[KK] <sup>p</sup> LCCIB	ے 1
0	p	$110-1101x^{-5}$	[-90,-33] <sup>P</sup>	[JJ]F ED CIRECDIR	1
9	P2	H10/12-nelix <sup>1730</sup>	[91,-99] <sup>8</sup> [100,-90] <sup>3</sup>	$[SX]^{\beta}[XS]^{\beta}$ $[SX]^{\beta}[RX]^{\beta}$	2
			[90,-100] <sup>β</sup> [-100,90] <sup>β</sup>	$[RX]^{\beta}[XX]^{\beta}$	
10	β <sub>3</sub>	H14/16-hélix <sup>171</sup>	[-87,118] <sup>β</sup> [117,-83] <sup>β</sup> [-153,-156] <sup>β</sup>	$[S, R]^{\beta}[R, S]^{\beta}[S, S]^{\beta}$ $[S, R]^{\beta}[R, S]^{\beta}[S, X]^{\beta}$	3
11	γ	H14-hélix <sup>61</sup>	[-133,-151] <sup>γ</sup>	$[SXS]^{\gamma}$	2
12	αβ	H14/15-hélix <sup>81,83</sup>	[77,31] <sup>α</sup> [140,108] <sup>β</sup>	$[R]^{\alpha}[RR]^{\beta}$	4
13	αβ	H11-hélix <sup>83</sup>	[58 35]∝[94 83] <sup>β</sup>	[R]∝[RR] <sup>β</sup>	2
				$[R]^{\alpha}[RX]^{\beta}$	_
14	αβ	H9/11-hélix <sup>80,172-174</sup>	[-70 <b>,125</b> ]∝[100,-76] <sup>β</sup>	$[S]^{\alpha}[RS]^{\beta}$	2
			[68,-128] <sup>α</sup> [-102,72] <sup>β</sup>	$[R]^{\alpha}[SX]^{\beta}$	
15	$\alpha\beta_2$	H11 <sub>2</sub> /12-hélix <sup>97</sup>	[-57,-35] <sup>α</sup> [-101,-91] <sup>β</sup> <sub>2</sub>	$[X]^{\alpha}[SS]^{\beta}_{2}$	2
16	$\alpha_2\beta$	H10/11 <sub>2</sub> -hélix <sup>97</sup>	[-54,-31] <sup>α</sup> <sub>2</sub> [-99,-85] <sup>β</sup>	$[X]^{\alpha_2}[SS]^{\beta}$	2
17	α3βα2β	H14 <sub>6</sub> /13-hélix <sup>124</sup>	[-61,-48]∝[-60,-55]∝—	$[R]^{\alpha}[R]^{\alpha}$	4
			[-64,-39]∝[-120,-104] <sup>β</sup> −	$[R]^{\alpha}[RX]^{\beta}$	
			[-64,-38] <sup>α</sup> [-77,-44] <sup>α</sup> —	$[R]^{\alpha}[R]^{\alpha}$	
			[-104 <b>,</b> -104] <sup>β</sup>	$[RX]^{\beta}$	
18	$\alpha\beta_2\alpha\beta_2$	H9/10/11/12-hélix <sup>171</sup>	[148,-79] <sup>α</sup> -	$[R]^{\alpha}$	2
			[-87,98] <sup>β</sup> [105,-90] <sup>β</sup> _	$[S,R]^{\beta}[R,S]^{\beta}$	
			[-63,151] <sup>α</sup> [90,-94] <sup>β</sup> –	[ <i>S</i> ]α[ <i>R</i> , <i>S</i> ]β_	
			[-87,114] <sup>β</sup>	[ <i>S</i> , <i>R</i> ] <sup>β</sup>	
19	αγ	H12-hélix <sup>102</sup>	[57,41]α[135,110]γ	$[R]^{\alpha}[RRR]^{\gamma}$	2
20	αγ	H10/12-hélix <sup>103</sup>	[-72,126]α[150,-97]γ	$[S]^{\alpha}[RXX]^{\gamma}$	2
21	βγ	H13-hélix <sup>104</sup>	[-134,-86] <sup>β</sup> [-147,-130] <sup>γ</sup>	$[SS]^{\beta}[SSS]^{\gamma}$	2
22	α	β-szál	[-120,113] <sup>α</sup>	$[S]^{\alpha}$	а
23	α	α-szál (DL- stabilizált) <sup>175,176</sup>	[-50,-50]∝[50,50]∝	$[S]^{\alpha}[R]^{\alpha}$	а
24	β	nyújtott poláris szál <sup>55</sup>	[144,-154] <sup>β</sup>	$[RS]^{\beta}$	a
25	β	Z6 nem-poláris szál <sup>177,178</sup>	[-160,75] <sup>β</sup>	$[SR]^{\beta}$	а
26	$\beta_2$	alternáló poláris szál <sup>49</sup>	[147,170] <sup>β</sup> [-126,-163] <sup>β</sup>	$[SS]^{\beta}[RR]^{\beta}$	a
27	γ	alternáló nem-poláris szál 67,179	[171,137]γ	$[XR]^{\gamma}$	а

<sup>a</sup>Nem alkalmazható.

<sup>b</sup>Felső indexek az aminosavmaradék típusát jelölik.

<sup>d</sup> A gerinc (i - i + n) H-kötései közötti távolság egész aminosav egységekben számítva (n).

 $<sup>^{</sup>c}X$  az oldallánc nélküli metilén- (CH<sub>2</sub>) vagy a szimmetrikusan diszubsztituált (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-, Aib) centrumokat jelöli. A CIP konfigurációk az oldalláncok hipotetikus Me-szubsztitúciójával szerepelnek az összehasonlítható térbeli orientáció érdekében.



**17. ábra** A gerinc sztereokémiai konfigurációi és az indukált diéderes szögek közötti összefüggés az 1. táblázat adatai alapján. A  $C_{\alpha}$  and  $C_{\omega}$  rendre a  $\psi$  and  $\varphi$  torziók melletti aszimmetrikus szénatomokat jelölik (az  $\alpha$ -aminosav egységekre  $C_{\alpha}$  és  $C_{\omega}$  azonos atomot jelöl). Magasabb homológokra a  $\varphi$  and  $\psi$  torziókat a szomszédos sztereocentrum orientálja: S konfiguráció  $\varphi$ ,  $\psi < 0^{\circ}$  szögeket indukál, míg  $R \varphi$ ,  $\psi > 0^{\circ}$  szögekhez vezet.

A 17. ábrán összefoglalt adatok azt mutatják, hogy a  $\varphi$  torzióra kifejtett irányító hatás a nagyobb homológoknál megmarad. Új jelenség viszont, hogy a  $\psi$  torzió is megkötötté válik a szomszédos aszimmetrikus szénatom és a távolabbra kerülő szomszédos peptid-kötések miatt. Röviden összefoglalva a kísérleti adatok elemzésével kapott összefüggést: *S* konfiguráció  $\varphi$ ,  $\psi < 0^{\circ}$  szögeket indukál, míg R  $\varphi$ ,  $\psi > 0^{\circ}$  szögekhez vezet. Ezt a gyakorlati megfigyelést az *ab initio* elméleti számítások messzemenően alátámasztják<sup>44,131</sup> és azt mutatják, hogy a gerincben aszimmetrikusan szubsztituált  $\beta$ -peptidek nem flexibilisebbek az  $\alpha$ peptideknél. Ezekből következően gyűrűs oldallánc alkalmazása esetén a konformációs szabadság csökken az  $\alpha$ -peptidekhez képest.

További vizsgálódásunk a periodikus másodlagos szerkezet jellege és a ( $\varphi$ ,  $\psi$ ) torzió párok közötti összefüggésre irányul. Az ilyen elemzést Ramachandran-típusú diagramokkal kezdhetjük meg, de a szokásos módon *az n.* aminosavegység ( $\varphi$ ,  $\psi$ ) torzió párjait egymással szemben ábrázolva nem kapunk hasznos összefüggést (18a. ábra). Ugyanakkor a kiértékelés keretét egy fél aminosavegységgel elcsúsztatva és a  $\varphi$ (n) vs.  $\psi$ (n-1) párokat egy peptidkötés köré csoportosítva érdekes elrendeződés rajzolódik ki (18b. ábra).

dc\_335\_11



**18. ábra**. Ramachandran-típusú  $\varphi(n)$  vs.  $\psi(n)$  (a) és a peptidkötés központú  $\varphi(n)$  vs.  $\psi(n-1)$  (b) ábrázolása a peptid foldamerek másodlagos szerkezeteinek. Az adatok az 1. táblázatból származnak.



**19. ábra.** A 18. ábráról leolvasott összefüggések térbeli szemléltetése (a) és a peptid-építőelemek illeszkedése a másodlagos szerkezet globális görbületébe (b).

A hélixeknek megfelelő pontok az I. és III. síknegyedben csoportosulnak, míg a szálak a II. és IV. síknegyedben találhatók. Ez az összefüggés azt mutatja, hogy a másodlagos szerkezeti típusoknál a peptidkötés két oldalára kell a figyelmünket fordítani és nem az aminosav egységeken belül kell vizsgálódnunk. Hélixeknél a gerinc a peptidkötés síkjának azonos oldaláról csatlakozik (azonos előjel, I. és III. síknegyed). Ha ez a peptidláncon konzekvensen végighalad, akkor kialakulhat a hélixek gerincére jellemző állandó irányú görbület (19a. ábra). Szálak esetén a gerinc szegmensek a peptidkötés síkjának ellentétes oldalán futnak be (váltakozó előjel, II. és IV. síknegyed). Ilyenkor az egymásra következő ellentétes irányítottságok a szálak kialakulásához szükséges váltakozó gerinclefutást eredményeznek. Fontos, hogy a peptidkötés építőelemeknek illeszkedniuk kell a másodlagos

szerkezet globális görbületébe, ezért a torziók előjele eldönti a peptid-csoport orientációját is a hélix tengelyéhez vagy a szál síkjához képest (19b. ábra).

A periodikus másodlagos szerkezet kialakulásának feltétele, hogy az ily módon felfűzött H-kötés pillérek egymásra illeszkedjenek. Ehhez az kell, hogy a peptidkötések relatív orientációja ismétlődő, komplementer motívumot mutasson: pl. egy 3 aminosav egység periodicitású hélixnél minden harmadik peptid-csoportnak azonos irányúnak kell lennie. Ennek egy szélső esete az  $\alpha$ -hélix, ahol minden peptidkötés azonos irányú, de elképzelhető ennél bonyolultabb elrendezés is, pl. a kevert  $\beta$ -hélix vagy a H10/12  $\beta$ -peptid hélix. A szálaknál ez az önfelismerő készség eleve adott, mivel a szálak önmagukkal gyakran komplementerek az amid-csoportok orientációját tekintve. Ez is vezet az itt annyira jellemző aggregációs jelenségekhez (ld. 4.4 fejezet).

A fenti megállapítások összefüggést teremtenek a másodlagos szerkezetek típusai, szerkesztési alapelvei és a  $\varphi, \psi$  torziók mintázata között. Továbbá abba is bepillantást nyerhettünk, hogy a sztereocentrumok konfigurációi hogyan befolyásolják a kérdéses torziókat. Így a következő szabályokat követhetjük: (i) hélix esetén az egyes peptidkötéseket határoló sztereocentrumoknak azonos térbeliségűeknek kell lenniük, és a sztereokémiai mintázatnak ismétlődőnek kell lennie a tervezett hélix periodicitásának megfelelően; (ii) szálak esetén az egyes peptidkötéseket határoló sztereocentrumoknak ellentie, és a rendszer önfelismerő képessége miatt kiterjedt aggregációra kell számítani. Fontos megjegyeznünk, hogy a sztereokémiai irányító hatás ellentétesre fordulhat, ha ezt bizonyos sztereoelektronikus vagy lokális elektrosztatikus kölcsönhatások lehetővé teszik. Ezeket a példákat nemrégiben összefoglaltuk [2].

#### 4.1.2 Z6-szál létrehozása gyűrűs oldalláncokkal sztereokémiai kontroll mellett [4]

Ennek a munkának két fő kiinduló pontja volt. Az egyik, hogy a *transz*-(1R,2R)-ACPC egységek homooligomerjei H12 hélixet képeznek (1. táblázat, 6. sor). Ezek a láncok fontos képviselői a homokirális  $\beta$ -peptid hélixeknek. Megvizsgálták ezek stabilitását nyíltláncú  $\beta$ <sup>3</sup>-aminosav helyettesítések hatására, illetve a gyűrűben heteroatomot tartalmazó *transz*-APC esetén. A másik előzményt az 5. ábrán bemutatott kanyar egységekkel kikényszerített minimál redő modellek adták. Ezekben az esetekben a hélixek kialakulására nem volt esély a rendkívül rövid (1 - 2 aminosav egység) szál szegmensek miatt. Bár a monomereken belüli sztereokémiai elrendezést tudatosan a szálak képzésére alakították ki, valójában a kanyar szegmensek hatásait figyelték meg oldatfázisban. Addig gyűrűs oldalláncokkal, amely a  $\theta$  torziót gauche konformációba zárja, nem tartották lehetségesnek a szál képződését. A célkitűzésünk az volt, hogy az ACPC gyűrűs oldalláncok rendező hatására támaszkodva az aminosavegységek relatív térkémiáját *cisz*-(1R,2*S*)-orientációba váltva megvizsgáljuk a lánc szerkezetképző hajlamát (20. ábra).





20. ábra. A vizsgált cisz-(1R,2S)-ACPC homooligomerek

A szintézis Boc technikával történt, az anyagokat a HPLC-s tisztítás és MS karakterizálás után NMR spektroszkópiával vizsgáltuk. A vizsgálatokat 1 – 8 mM koncentráció tartományban végeztük DMSO-d6-ban és nem tapasztaltunk jelkiszélesedést, szignifikáns kémiai eltolódást vagy változást a ROESY spektrumok keresztcsúcs-mintázatában. A 4.4.1 fejezetben bemutatom ezeknek az anyagoknak fibrillumba való önrendeződését, ami kb. 1 hét időtartományon következett be vizes oldatban illetve metanolban. Így ebben a fázisban az NMR vizsgálatokat nem zavarta ez a lassú, protikus oldószert igénylő folyamat, és valódi oldatfázisú geometriát figyelhettük meg. Valamennyi NH, CaH és CBH rezonanciát hozzárendeltük. A 4 és 5 vegyületek nagyon hasonló ROESY keresztcsúcs elrendeződést mutattak, de az 5-nél tapasztalt kevésbé kielégítő kémiai eltolódás diszperzió miatt a teljes nagyfelbontású szerkezetfinomítást a 4 vegyületre végeztük el. Négy távolható NHi - C<sup>β</sup>Hi+1 és NHi - C<sup>B</sup>Hi-1 NOE kölcsönhatást tudtunk azonosítani i = 1, 2 és 3-ra. A többi a lánc Cterminálisát érintő (i = 4 és 5) kölcsönhatás a ROESY multiplettek alakjából és a megnövekedett keresztcsúcs intenzitásokból sejthető volt. Ezért szelektív 1D TOCSY-ROESY NMR kísérleteket hajtottunk végre úgy, hogy szelektíven besugároztuk a kérdéses NH szignálokat, utána rövid 30 ms hosszúságú homonukleáris Hartmann-Hahn keverést, majd végül 400 ms ROESY spin-lock-ot alkalmaztunk. Így a mágnesezettség az első lépésben NHi -> C<sup>β</sup>Hi, majd másodikban a C<sup>β</sup>Hi -> NHi+1 és C<sup>β</sup>Hi -> NHi-1 útvonalon haladt, amennyiben az utóbbi spinek térközelsége fennállt. Kontroll kísérletekben ellenőriztük, hogy a 30 ms TOCSY transzfer valóban csak a vicinális csatolásig vitte a mágnesezettséget és e köztes lépés nélkül a kérdéses NH protonok között nem volt kölcsönhatás. Az összesített eredményt a 21. ábra mutatja be.



**21. ábra.** Az NOE kölcsönhatások **4** esetén a szokásos ROESY spektrumban feloldott jelek (a, piros) és a szelektív 1D-TOCSY-ROESY kísérletsorozatban kapott jelek (b, kék).

Így a teljes periodikus NH<sub>i</sub> - C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>i+1</sub> és NH<sub>i</sub> - C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>i-1</sub> NOE kölcsönhatás sorozatot fel tudtuk fejteni végig a lánc hosszában, ami kizárta a helikális és random konformációkat és megerősítette azt a hipotézisünket, hogy a szerkezet szál-szerű geometriát mutat. A szekvenciális NH<sub>i</sub> - C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>i</sub> és NH<sub>i</sub> – C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>i-1</sub> NOE kölcsönhatásokat további kvantitatív elemzésnek vetettük alá. Az (1) képlettel definiált korrigált ROESY keresztcsúcs intenzitás arány (**R**) érzékenyen függ a másodlagos szerkezet típusától.

 $\mathbf{R} = \mathbf{I}_{\mathbf{nOe}}(\mathbf{NH}_{i} - \mathbf{C}^{\alpha}\mathbf{H}_{i-1}) / \mathbf{I}_{\mathbf{nOe}}(\mathbf{NH}_{i} - \mathbf{C}^{\beta}\mathbf{H}_{i})$ 

Modelleztük azokat a másodlagos szerkezeteket, amelyek elvileg kialakulhattak a *cisz*-ACPC homooligomerekből és az elméletileg becsült **R** adatokat összevetettük a kísérleti értékekkel (22a ábra). A legjobb egyezést a Z6-szál esetén kaptuk és a random szerkezet (**R** = 2,1) is

(1)

kizárható volt. Ezt támasztja alá az is, hogy a  ${}^{3}J(NH_{i} - C^{\beta}H_{i})$  csatolások egyöntetűen 8,2 Hznek adódtak, ami ennél a diéderes szögnél az antiperiplanáris konformációt mutatják.



**22. ábra.** A szekvenciális NOE intenzitások kvantitatív elemzése (a) és a szerkezetfinomítással kapott 30 legkisebb energiájú szerkezet felül (b) és oldalnézete (c).

Az alapos elemzés meggyőzött minket arról, hogy oldatfázisban az NMR adatok egy predomináns konformációról tanúskodnak, ezért szimulált hűtési eljárással, a ROESY és a szelektív ROESY adatok felhasználásával szerkezetfinomítást végeztünk. Eredményül újra Z6 szál struktúrát kaptunk, megerősítve az addigi hipotézisünket (22b és c ábra). Ez meglepetést okozott, mert a 6-tagú hidrogénkötések geometriája nem ideális a stabilizáláshoz és felvetődött a kérdés, hogy mennyiben játszanak a H-kötések szerepet a lokális konformációs irányítás mellett. A lánchossz- és oldószerfüggő IR vizsgálatok azt mutatták, hogy CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>ben (H-kötés elősegítő oldószer) az amid I régióban kiemelkedő intenzitást kapunk 1645 cm<sup>-1</sup>-nél **4** és **5** vegyületekre, amíg **3** esetén csökken a relatív intenzitás. Ez sáv DMSOban (H-kötés romboló oldószer) átadja a helyét egy 1670 cm<sup>-1</sup>-nél jelentkező sávnak utalva a megszűnő H-kötésekre. Ebből arra következtettünk, hogy 6-tagú H-kötések kialakulhatnak aprotikus, nem kaotróp oldószerben, de a DMSO-ban NMR segítségével megfigyelt jól meghatározott szerkezetet elsősorban a sztereokémia lokális irányító hatása kényszeríti ki.

Az ECD spektrumokat metanolban és trifluoretanolban vettük fel, és a görbék jelentősen különböző képet mutattak a hélixeknél megfigyelt közel szimmetrikus Cotton effektushoz képest (23. ábra). Ez volt az első szál másodlagos szerkezetre megfigyelt ECD mintázat. A 4 és 5 szekvenciákra kapott ECD görbék nagyon hasonlóak voltak, de a hosszabb láncú 5 nagyobb ECD intenzitást adott. A lokális hatások által rendezett másodlagos szerkezetnél a kooperatív hatásokkal kevésbé kellett számolnunk, ezt azzal magyarázhatjuk, hogy a mozgékonyabb terminális aminosav egységek aránya kisebb a hosszabb láncban. Nem zárhatjuk ki azonban, hogy a peptid kötések váltakozó dipólus momentumai hozzájárultak az elektrosztatikus stabilizáláshoz.



23. ábra. A 4 (vastag) és 5 (vékony) láncokra kapott ECD görbék metanolban.

Ebben a munkában megmutattuk, hogy a sztereokémiai mintázat megváltoztatása hatékonyan szól bele a másodlagos szerkezetbe. A kiindulópontot adó [RR][RR]<sub>n</sub> mintázatú H12 hélixet [SR][SR]<sub>n</sub> elrendezésre váltottuk, így a peptid kötések két oldalán ellentétes konfiguráció alakult ki, ami a H-kötések jelentős hozzájárulása nélkül is az elsőként megfigyelt nem-poláris Z6-szál létrejöttéhez vezetett.

# 4.1.3 H10/12 hélix és poláris szál létrehozása gyűrűs oldalláncokkal és alternáló sztereokémiai mintázattal [5]

Az alternáló szekvenciák alkalmazása, mint konstrukciós elv a H10/12 hélix felfedezésével jelent meg a foldamerek körében (1. táblázat, 9. sor). Az első ilyen hélixet a Seebach csoport közölte, és ez a váltakozó  $\beta^3$ - és  $\beta^2$ -oldalláncokkal kiépülő hélix korlátozott stabilitást mutatott poláris oldószerekben. A sztereokémia szerepét azonban nem ismerték fel a szerkezetformálásban. Célunk az volt, hogy a Z6 szál létrehozásánál felismert erős sztereokémiai irányító hatást alkalmazzuk a peptid kötések hélixen belüli alternáló irányítására. Ezzel és a ciklusos oldalláncokkal oldószereknek jobban ellenálló H10/12 hélixhez kívántunk jutni (24. ábra). Továbbá megvizsgáltuk, hogy ugyanezen elvek mentén lehetséges-e poláris szál előállítása a ciklusos építőelemekből.



6, n = 1; 7 n = 2; 8, m = 1; 9, m = 2

**24.** ábra. A vizsgált alternáló heterokirális H-[(1S,2R)-ACPC-(1R,2S)-ACPC]<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> és H-[(1R,2R)-ACPC-(1S,2S)-ACPC]<sub>m</sub>-NH<sub>2</sub> szekvenciák.
Mivel a láncok térkémiai viselkedésének 4.1.1 pontban leírt elveire akkor még nem volt teljes rálátásunk, a tervezett irányító hatást *in silico* teszteltük a 7 és 9 láncokra. Az első lépésben szimulált hűtés protokollt alkalmaztunk kísérleti megkötések nélkül a konformációs mintavételezésre. A 7 és 9-re kapott legalacsonyabb energiájú konformációs családokból egy-egy reprezentatív szerkezetre *ab initio* optimalizálást indítottunk előbb HF/3-21G, majd B3LYP/6-311G\*\* elméleti szinten, amelyek megfelelően konvergáltak. Ezeknél a számításoknál oldószer modellt nem használtunk. A 7 vegyületre a konformációs keresés a H10/12 hélixet prediktálta, míg egy Z8-szál-szerű struktúrát kaptunk 9-re (25ab. ábra).



**25. ábra.** A **7** (a) és **9** (b) láncokra kapott *ab initio* szerkezetek (izolált molekulákra vákuumban). Parallel (c) és antiparallel (d) redő modellek **9**-re (MMFF94 erőtérrel és implicit vízzel).

Mivel a szálak hajlamosak az önfelismerő aggregációra, a 9 potenciális redős modelljeit is megépítettük. A peptid kötések orientációja azonosnak bizonyult, így a poláris szálakkal parallel és antiparallel redős dimer modelleket építettünk. A szerkezetet implicit vízben optimáltuk molekuláris mechanikai erőtérrel (25c és d. ábra). Ezek a modellek stabilisnak mutatkoztak, ahol a szálak közötti H-kötések ideálisan illeszkedtek és nem volt sztérikus taszítás a láncok között.

Az ígéretes számítási eredmények alapján **6** - **9** szekvenciákat megszintetizáltuk Boc kémiával, **9** esetén az utolsó kettő kapcsolási lépés nehézségekbe ütközött és csökkent termelést kaptunk. A termékeket kellő tisztaságban kaptuk meg és HPLC és MS karakterizálás után NMR vizsgálatokba kezdtünk 4 mM CD<sub>3</sub>OD, DMSO- $d_6$  és víz (90% H<sub>2</sub>O + 10% D<sub>2</sub>O) oldószerekben. A jelek feloldottsága jónak bizonyult **6** és **7** esetén, így a rezonanciák hozzárendelése a gerinc mentén nem ütközött nehézségbe, az NMR jelek sem utaltak aggregációra. Sajnos **8** és **9** esetén nagyon rossz jeldiszperziót tapasztaltunk, ami megakadályozta a további szerkezetfinomítási lépéseket.

dc\_335\_11



**26. ábra.** Az NH/ND kicserélődés időfüggése **7** esetén (CD<sub>3</sub>OD), ○ : NH<sub>3</sub>; ▲ : NH<sub>4</sub>; ■ : NH<sub>5</sub>; X : NH<sub>6</sub>.

Hélixek esetén kialakulhatnak intramolekuláris H-kötések, és ezért a NH protonok részlegesen árnyékolttá válnak az olszószerttől. Erre a jelenségre a konkrét szekvenciától függően, a közvetlen N<sup>1</sup>H-N<sup>2</sup>D cseresebesség megfigyelésével vagy az NH jelek hőmérsékletfüggő eltolódásából következtethetünk. Itt a közvetlen módszert alkalmaztuk CD<sub>3</sub>OD oldószerben és **7** esetén azt találtuk, hogy az N-terminális NH<sub>2</sub> és a C-terminális amid protonok azonnal lecserélődtek, de a többi szignál hosszabb ideig megfigyelhető volt (26. ábra). A cseresebesség a lánc közepén bizonyult a legalacsonyabbnak és jó összhangot mutatott a H10/12 modellünkkel. Hasonló mintázatot kaptunk **6**-ra, de ott a cseresebességek általában nagyobbak voltak, ami egy kevésbé rendezett szerkezetre utalt. A ROESY kísérletek **7** esetén CD<sub>3</sub>OH és DMSO-*d*<sub>6</sub> oldószerekben a jellemző C<sup>6</sup>H<sub>2</sub>-NH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>-C<sup>6</sup>H<sub>5</sub> és C<sup>6</sup>H<sub>4</sub>-NH<sub>6</sub> távolható NOE kölcsönhatásokat adtak, amelyek alátámasztották a prediktált H10/12 hélix másodlagos szerkezetet (27. ábra).



27. ábra. 7 szekvencia esetén megfigyelt távolható NOE kölcsönhatások.

Az alternáló peptid kötés orientáció és a kompakt hélix konformáció miatt a szomszédos amid protonok térközelbe kerülnek. Az ebből fakadó ROESY keresztcsúcsokat ki is tudtuk mutatni (NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub> és NH<sub>5</sub>-NH<sub>6</sub>), így valamennyi, a szerkezetre jellemző NOE kölcsönhatást

megtaláltuk. A spektrumokban inkonzisztens NOE-t nem figyeltünk meg. A  ${}^{3}J(C^{\beta}H_{i}-NH_{i})$  csatolások alternáló mintázatot mutattak, 9,8 Hz volt C<sup>\beta</sup>H\_3-NH<sub>3</sub> és C<sup>\beta</sup>H\_5-NH5 esetén, míg 7,8 Hz volt a C<sup>\beta</sup>H\_2-NH2, C<sup>\beta</sup>H\_4-NH4 és C<sup>\beta</sup>H\_6-NH6 vicinális csatolásokra. Az értékek teljes összhangban vannak a H10/12 szerkezettel. A rövidebb **6** szekvenciára csak egy gyenge C<sup>\beta</sup>H\_2-NH4 NOE kölcsönhatást találtunk, ami sokkal kevésbé stabilis hélixre utalt. Vizes közegben egyik anyagnál sem tudtunk távolható NOE kölcsönhatásokat megfigyelni és a szigorúan alternáló csatolási állandó mintázat sem jelent meg. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy az általunk konstruált H10/12 hélix kellően stabilis protikus metanolban és a kaotróp DMSO-ban, de a szerkezet vízre érzékeny.

A 6 és 7 láncokkal végzett ECD mérések metanolban pozitív Cotton effektust mutattak 210 nm-nél pozitív és 190 nm-nél negatív sávval, de a görbe intenzitása 6-ra jóval alacsonyabb volt. A vizes felvétel szintén mutatott gyengébb intenzitású Cotton effektust jelezve, hogy ugyan a korábbi H10/12 hélixekkel ellentétben van maradék hélix-tartalom, de a görbe inkább aszimmetrikussá vált utalva egy időátlagban nyújtottabb szerkezetre (v.ö. 23. és 29 ábrákkal). Érdekes hogy ez az aszimmetria a többi oldószerben is rigidebbnek mutatkozó 7 esetén kisebb mértékű volt.



**28.** ábra. ECD eredmények metanolban (a) és vízben (b) **6** (vékony) és **7** (vastag) esetén. VCD görbék (c)  $CH_2Cl_2$ -ben (vastag folytonos), DMSO-ban (vékony folytonos) és az elméleti VCD görbe (szaggatott).

Mivel szerves oldószerekben a H10/12 hélixünk jól definiált szerkezetet mutatott 7 esetén, megkíséreltük a vibrációs CD spektrumait is felvenni és az elméletileg számított görbével összevetni (28c. ábra). Mind a DMSO-ban, mind pedig a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-ben felvett spektrumok jelentős rotátorerősségeket mutattak az amid I és II sávokban. Továbbá az *ab* 

*inito* H10/12 hélix modellünkre elméleti úton számított görbe nagyon jó egyezést mutatott a kísérleti adatokkal a frekvenciák és a rotátorerősségek előjeleinek tekintetében. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a javasolt szerkezet nagyon jó közelítése a valós hélixnek, a helicitás iránya helyes, és a H10/12 hélix valóban predomináns ezekben az oldószerekben.

Ahogy fent említettem, az NMR mérések nem bizonyultak hasznosnak 8 és 9 esetén, de ez még nem feltétlenül zárja ki az önrendeződésre való hajlamot. ECD méréseket tudtunk végezni és 9-re egy aszimmetrikus Cotton effektust kaptunk metanolban 190 nm környéki negatív és 205 nm-nél pozitív sávval (29. ábra). A görbe jellegét nézve hasonlít a *cisz*-ACPC homokirális homooligomerekre kapott adatokhoz, ahol a szál másodlagos szerkezetet hozzá tudtuk rendelni. Ez arra utalt, hogy itt is szál szerkezetet kaptunk. A szál szerkezetet jól alátámasztó fibrillumképződést a 4.4.1 fejezetben mutatom be.



29. ábra. A 9 esetén kapott ECD görbe metanolban (1 mM).

Ebben a munkában a sztereokémiai mintázat variálását kiterjesztettük dipeptid egységekre, így eljutottunk a tervezett alternáló szekvenciákhoz. Az kapott  $[SR][RS]_n$  típusú sztereokémiai mintázatnál (6 és 7) az egyes peptid kötések két oldalán mindig azonos a térkémiai irányítás, de az R][R és S][S párok váltakozva következnek, és így a peptid kötések orientációja is váltakozik. Ezekből a lokális konformációs kényszerekből következően alakul ki a H10/12 altenáló hélix. Az így bevezetett gyűrűs oldalláncok még kaotróp oldószerben is stabilizálni tudták a szerkezetet és 7, a nyíltláncú egységből épített H10/12 hélixekkel ellentétben, vízben is mutatott maradék helicitást. Az  $[RR][SS]_n$  típusú mintázattal (8 és 9) a szál képződés irányába tereltük a láncokat, viszont itt a váltakozó R][S és S][R párok a szál zegzugos lefutása miatt uniform irányítottságot adtak a peptidkötéseknek. Az így kapott poláris szál fibrillumképződési tulajdonságait a 4.4.1 fejezetben tárgyalom.

#### 4.1.4 Sztereokémiai kontroll kiterjesztése aza,β-peptid heterogén szekvenciákra [6]

A biológiai alkalmazásoknál egy kulcsfontosságú kérdés, hogy vajon a ligandumként felhasznált foldamerek megtartják-e vizes oldatban is a szerkezetüket. Ez nagy kihivást jelent a tervezésnél és erre több megoldást is javasoltak az irodalomban. A homogén orientációjú

hélix típusoknál a hélix makrodipólusához alkalmas terminális töltést szerkesztve stabilizálhatjuk a szerkezetet.<sup>169</sup> A többi megoldás a juxtapozícióban lévő oldalláncok között létesít stabilizáló kölcsönhatásokat, mint pl. a diszulfid híd<sup>114</sup> vagy sóhíd.<sup>180</sup> A probléma ezekkel, hogy vagy a hélixek csak egy altípusánál használható és/vagy az oldalláncok kémiáját fel kell áldozni az extra stabilitás érdekében. Ebben a munkában azt kívántuk megmutatni, hogy a hélixek szerkezeti stabilitása tovább fokozható a gerinc megfelelő kémiai módosításával és a sztereokémiai kontrollal együttesen. A 2.2.3 szakaszban elemeztük, hogy a peptid foldamerek gerincében megfelelően végrehajtott nitrogén helyettesítés a H-kötés pillérek erősségét jelentősen növelheti. Itt azt a megoldást választottuk, hogy aminoprolin építőelemeket (aza-ACPC) alternálva kapcsoltunk ACPC monomerekkel, úgy hogy a 4.1.2 és 4.1.3 fejezetekben leírt sztereokémiai gerinc mintázatokkal bejárhassunk többféle másodlagos szerkezeti típust (30. ábra).



**30. ábra.** A vizsgált alternáló heterogén aza,β-peptid foldamer szekvenciák.

A konkrét szekvenciákat úgy terveztük meg, hogy a homokirális és a heterokirális alapszekvenciák analógjai is elkészüljenek: Ac-[(1*S*,2*R*)-ACPC-2*S*-aza-ACPC]<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (**10**), Ac-[(1*R*,2*S*)-ACPC-2*S*-aza-ACPC]<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (**11**), Ac-[(1*S*,2*S*)-ACPC-2*S*-aza-ACPC]<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (**12**) and Ac-[(1*R*,2*R*)-ACPC-2*S*-aza-ACPC]<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (**13**). A szekvenciák Boc kémiával készültek, a szokásos HPLC tisztítás és LC-MS jellemzés után NMR mérésnek vetettük alá őket. A méréseket CD<sub>3</sub>OH and DMSO-*d*<sub>6</sub> és pH 7,4 vizes pufferben végeztük 4 mM koncentrációban, melyben az anyagok kiváló oldékonyságot mutattak. Vizes közegben az azapeptid NH jelek 298 K-en szélesek voltak és kiélesedtek 277 K-en. Asszociációra utaló jel az NMR-ben nem volt, sem DOSY, sem a TEM mérések nem mutattak aggregátumokat. A jelkiszélesedés ennek alapján az azapeptid NH-k gyorsabb NH/oldószer cseréjéből fakad, aminek oka az erre a funkciós csoportra jellemző megnövekedett H-kötési donorerősség (savasság).<sup>181</sup> Ezt alátámasztották a relatíve intenzívebb víz-azapeptid NH kicserélődési csúcsok a ROESY spektrumban. Fontos még kiemelni, hogy pH 7,4-en kvaterner

nitrogénekre (protonált gerinc nitrogén) utaló szignálokat nem találtunk. A csatolási állandók sem mutattak hőmérséklet-függést, kizárva ezzel a konformációs inhomogenitást.

Ezeknél a szerkezeteknél a polárisabb gerinc miatt a közvetlen NH/ND csere mérést nem tudtuk alkalmazni. Az NH kémiai eltolódások hőmérséklet-függését ( $\Delta\delta/\Delta T$ ) DMSO-*d*<sub>6</sub>-ban a 298-318 K tartományon mértük, hogy a gerinc NH-k árnyékoltságát megfigyelhessük (31. ábra). Sajnos az azapeptid részre referencia adatokat nem találtunk az irodalomban. A modelljeinkben a hőmérséklet gradiens szisztematikusan nagyobbnak adódott, mint a amidcsoportoké, de ezt a megnövekedett H-kötés donorerősséggel magyarázhatjuk. A nem terminális amid-csoportokra kapott értékek jellemzően  $\Delta\delta/\Delta T > -3$  ppb/K tartományban voltak **10**, **12** és **13**-re, ami erős árnyékolásra utal a valószínűleg kialakuló kompakt szerkezetek miatt. A **11** vegyület esetén csak NH3 mutatott erős árnyékolást, ami arra utalt, hogy szerkezet kanyar-szerű és részlegesen rendezett. Megjegyzem azonban, hogy  $\Delta\delta/\Delta T > -6$  ppb/K értékeknél árnyékolásról beszélhetünk.



**31.** ábra. A gerinc  $\beta$ -peptid (fekete) és az azapeptid (szürke) egységekhez tartozó NH jelek kémiai eltolódásainak hőmérséklet-függése ( $\Delta\delta/\Delta T$ ) DMSO- $d_6$ -ban. Panel a: **10**, b: **11**, c: **12** and d: **13**.

A **10** és **13** szekvenciák szerkezetfinomításához használt ROESY spektrumok mindhárom alkalmazott oldószerben jelgazdagok voltak és számos i – i+2 távolható NOE kölcsönhatást beazonosíthattunk (32. ábra). Fontos kiemelni, hogy a kölcsönhatásokat vizes pufferben is ki tudtuk mutatni 298 K-en csak a lassan cserélődő amid protonokra, 277 K-en pedig valamennyi gerinc szignálra. Ezek az eredmények egészen kivételes, ilyen rövid foldamereknél teljességgel szokatlan szerkezeti stabilitásra utaltak. A **11** lánc egyetlen i – i+4 NOE-t mutatott, ami összhangban állt az árnyékolt NH<sub>3</sub> protonnal. **12** esetén csak szekvenciális NOE-t kaptunk.



32. ábra. Távolható NOE kölcsönhatások 10 (a), 11 (b) és 13 (c) vegyületekre.

Mivel a gerinc bázisos nitrogéneket tartalmaz, a pH befolyásolhatja az önrendeződést és ezáltal a spektrális paramétereket. A NMR méréseket **10** és **13** esetén megismételtük pH 2,0 pufferben is. A savas közeg miatt három új szignált láttunk a spektrumokban megjelenni, amiket a protonált aza-nitrogénekhez rendeltünk. Sem kémiai eltolódás változásokat, sem pedig jelkiszélesedést nem találtunk az amid szignáloknál, továbbá a távolható NOE-k érintetlenek maradtak. Ebből arra következtettünk, hogy a protonálás az alacsony pH-n végbemegy a gerinc nitrogéneken, de ez nem vezet széttekeredéshez (v.ö. ECD eredményekkel).

A szerkezetfinomítást hibrid-Monte Carlo eljárással végeztük és protonálatlan kiindulási szerkezetekkel. A távolható kölcsönhatások **10** esetén egyetlen konformációs klasztert határoztak meg, ami megfelelt a H10/12 hélixnek (33a ábra). A **13** szekvencia ugyancsak egyetlen klasztert adott ami a H12 hélixnek felelt meg (33e ábra). Nem kaptunk a szerkezetekkel inkonzisztens NOE-kat és a tíz legalacsonyabb energiájú szerkezetet tekintve a prediktált NOE-kat megtaláltuk a spektrumokban.



**33. ábra.** Az NMR szerkezetfinomításból kapott tíz legalacsonyabb energiájú szerkezet a: **10**, b: **11**, c: **12** (1. klaszter), d: **12** (2. klaszter) és e: **13**.

A hélixeket közelebről megvizsgálva azt találtuk, hogy az aza-nitrogének nem kötő elektronpárjai nem vesznek közvetlenül részt a gerinc H-kötéseiben és az oldószer számára hozzáférhetők. Az implicit víz modellel és teljes protonáltság mellett végzett számítások megerősítették, hogy a protonálás mellett is stabilisak a hélixek, ami teljesen összhangban volt a pH-függő NMR adatokkal.

A **11** szekvenciára kapott legalacsonyabb energiájú klaszter egy kanyar struktúrát ad, amiben az NH3 bifurkált H-kötésben vesz részt (33b ábra). Ugyanakkor az alacsony energiájú szerkezetek által C-terminálison prediktált NOE kölcsönhatásokat nem tudtuk kísérletesen megfigyelni, ami arra utal, hogy az N-terminális részen egy meglehetősen stabilis kanyarszerkezet alakul ki, míg a C-terminális flexibilis marad. Két klasztert kaptunk hasonló energiával a **12** láncra, és mind a kettőben 8-tagú H-kötéses gyűrűket találtunk. A 1. klaszter

8-szál másodlagos szerkezetnek felelt meg (33c ábra), míg a 2. klaszter egy makrociklusos elrendeződést mutatott (33d ábra). Mivel az NH protonok árnyékoltsága kiderült a hőmérséklet-függő NMR adatokból, ezért úgy véljük, a H-kötéses 8-tagú gyűrűk valószínűek, de a globális tekeredése a szerkezetnek fluktuálhat.



**34. ábra.** VCD görbék a **10** (a) és a **13** (b) láncokra DMSO- $d_6$ -ban (folytonos), és a számított görbék (szürke szaggatott). ECD görbék a helikális szerkezetekre (c): **10** (szürke), **13** (fekete). A szál és kanyar szerkezetekre kapott ECD görbék (d): **11** (fekete), **12** (szürke). A pH 7,4 vizes pufferben kapott adatok (vastag), metanolban (vékony).

A **10** és **13**-ra kapott hélixeket *ab initio* kvantummechanikai szinten is optimalizáltuk, és a B3LYP/6-311G\*\* módszerrel kapott szerkezetekre elméleti VCD görbéket számítottunk, majd összehasonlítottuk a kísérleti adatokkal (34a és b ábrák). A kísérleti VCD görbék DMSO-ban jól észlelhető effektust mutattak az 1650 - 1700 cm<sup>-1</sup> tartományon, ami hozzárendelhető a csatolt amid I vibrációs módusokhoz. Ezt a lefutást az elméleti görbékben is megtaláltuk és a rotátorerősségek előjele illeszkedett. Ez alátámasztja, hogy az NMR szerkezetfinomításokkal és az *ab inito* számításokkal kapott balmenetes hélixek szerkezete helyes. Továbbá a relatíve jó egyezés a görbék között jelzi azt, hogy a hélixek konformációs stabilitása jelentős. A **13**-nál észlelhető nagyobb intenzitású effektus betudható a H12 gyakrabban ismétlődő konformációs elemeinek, ha a H10/12 hélixhez hasonlítjuk. Vannak azonban eltérések a kísérleti és elméleti görbék között a kevésbé jellemző és gyengébb amid II sávban (1500 - 1570 cm<sup>-1</sup>). Ezek a különbségek valószínűleg a szerkezetek maradék konformációs flexibilitásával és esetleges oldószerrel való kölcsönhatásokkal magyarázhatók.





**35. ábra.** A **10** (szürke) és **13** (fekete) szekvenciákra kapott ECD görbék pH 7,4 (vastag) és pH 2,0 (vékony) vizes pufferekben.

ECD méréseket is végeztünk, hogy megerősíthessük a hélixek jelenlétét és a szerkezetek szekvencia-függését. Szimmetrikus pozitív Cotton effektust kaptunk **10** és **13** esetén, a pozitív sávok 210 nm és a negatív sávok 195 nm környékén voltak (34c ábra). Ez alátámasztja a helikális geometriát mindkét anyagnál. A **11** és **12** szekvenciáknál az alapvetően aszimmetrikus effektus a 190 nm környékén megjelenő negatív sávokkal mindkét esetben nyújtott szál-szerű szerkezetet jelzett (34d ábra). Az NMR eredményekkel összhangban a vízben felvett ECD görbék hasonlóak a metanolban kapott adatokhoz, ami arra utal, hogy a szerkezetek ellenállnak a víz szerkezetromboló hatásának. Továbbá a helikális szekvenciák (**10** és **13**) pH 7,4 és pH 2,0 pufferben felvett görbéi gyakorlatilag azonosak voltak (35. ábra), ami újabb megerősítést ad az NMR-ben már tapasztalt azon jelenségnek, miszerint a gerinc protonálása nem vezet a szerkezetek széteséséhez.

Ezek az eredmények két fő következtetést engedtek meg. Az egyik, hogy az azapeptid építőelemek beváltották a hozzájuk fűzött reményeket, tehát stabilizálták a gerinc H-kötési hálózatát, ezáltal vizes oldószerben is sikerült a másodlagos szerkezeteket megőrizni. A másik megállapításunk, hogy a gyűrűs oldalláncokkal beprogramozott térkémiai mintázat kikényszerítette a távolható hidrogénkötések kialakulását, mivel a gerincben helyettesített akirális nitrogén alkalmazkodott a környező lokális torziós kényszerekhez. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy nem kell minden sztereocentrumot megkötnünk ahhoz hogy a másodlagos szerkezetet kiépíthessük. A sztereokémiai mintázat hatásának elemzésekor figyelembe kellett vennünk, hogy az aza-ACPC egységeknél az  $\alpha$ -szénatom CIP konfigurációja azonos térbeli orientáció mellett ellentétesre vált az ACPC egységekhez képest. Így a 2*S*-aza-ACPC monomereket a sztereokémiai mintázatban [*XR*] egységgel jelöltük az összevethetőség kedvéért. Az *X* az akirális nitrogénnek felelt meg. Így a mintázat **10** esetén [*RS*][*XR*], ami ahhoz vezetett, hogy minden második peptidkötés csak az egyik oldalról kapott

térkémiai irányítást, de a váltakozó S[X és R][R motívumok alternáló H10/12 hélixet alakítottak ki. Hasonlóan **13** esetén a mintázat [RR][XR] volt, ami váltakozó R][X és R][Rmotívumokat adott, de ez már azonos irányítást jelentett az amidcsoportok számára, és a nitrogének alkalmazkodásával a H12 hélixet kaptuk. A **11** és **12** szekvenciák rendre az [SR][XR] és [SS][XR] mintázatokat kapták, amelyek kizárják a hélixek kialakulásához szükséges orientációkat és ennek eredményeképp kanyar és szál jellegű másodlagos szerkezeteket találtunk.

#### 4.1.5 Foldamer hélixek de novo létrehozása proteinogén oldalláncokkal: sztereokémiai programozás kiterjesztése [1]

A foldamerek felszínén megjelenő kémiai diverzitás nagyon fontos a biológiai alkalmazások szempontjából. A proteinekhez hasonló foldamer felszín kialakításához egy lehetséges út, hogy a természetes  $\alpha$ -aminosav építőelemek oldalláncait építjük ki a struktúrák felszínére. Ehhez olyan építőelemek szükségesek, amelyeket költséghatékonyan lehet előállítani, és az α-aminosavakkal azonos vagy hozzájuk hasonló oldalláncokat hordoznak. Ilyen monomer típus a β3-aminosavak osztálya, mert α-aminosavakból Arndt-Eistert szintézissel előállíthatók,6 ezek jelenleg kereskedelemben hozzáférhetők. Egy másik közvetlen lehetőség az α-aminosavak beépítése a szekvenciába. Ahogy ezt az irodalmi áttekintésben már említettem (2.3.1 fejezet), ilyenkor számolni kell azzal, hogy az α-aminosavak mennyiségével csökken a hélixek konformációs stabilitása. Igaz ez a β3-aminosavak esetén is a hiányzó aszimmetrikus β<sup>2</sup>-szénatom miatt. Viszont a fenti eredményekből kitűnik, hogy a lokális torziók térkémiai irányítása hatékonyan befolyásolja a másodlagos szerkezetet a megadott szabályok szerint még akkor is, ha nincs minden aszimmetria centrum meghatározva. Ezt az elvet követve terveztünk új hélixeket, amelyek proteinogén oldalláncokkal rendelkeznek. A 36. ábrán mutatom be a tervezett szekvenciákat, ahol az oldalak dőlési iránya kódolja a peptidkötések relatív orientációját, illetve a trapézok és a paralelogrammák sorozatával ábrázoltam a monomer egységek térkémiai illeszkedését. Az egyik szekvencia-típusban (14 és 15) kizárólag β-aminosav egységeket használtunk, azonban a peptidkötések relatív orientációjának mintázatát hármas periódussal állítottuk be. A 14 szekvencia esetén minden oldallánc ciklusos volt, de ezt a láncot csak a modellezés szintjén tanulmányoztuk. A 16 foldamernél a peptidkötések orientációját alternálóra terveztük, de minden harmadik pozícióba α-aminosavat helyeztünk el. A 17-19 szekvenciákban megbontottuk a hélixet elősegítő sztereokémiai mintázatokat, hogy ellenőrizhessük a térkémiai orientáció hatását.

dc\_335\_11



**36.** ábra. A *de novo* tervezett  $\beta$ - és  $\alpha\beta$ -peptid szekvenciák (**14-16**) és a kvázi-random ellenőrző láncok (**17-19**). A tervezés a [ $\phi$ , $\psi$ ] szögek előjele és a sztereokémiai mintázatok szerint történt a 4.1.1 fejezetben leírt elvek alapján. Az oldalláncokat a szokásos egybetűs kódokkal jelöltük (hS: homo-szerin). A dőlt betűkkel a konfigurációkat CIP rendszerben adtuk meg úgy, hogy az oldalláncokat jelölő R = metil.

Érdekes megfigyelni, hogy mindkét típus túllép az addig szokásos alternáló tervezési elven. A 14 és 15 szekvenciáknál a peptidkötések orientációja és ennek megfelelően a sztereokémiai mintázat hármas periodicitást mutat. Ez 16 esetében még kiterjedtebb, mert a térkémiai információ hat monomeregységenként ismétlődik, amit más eszközökkel nehézkes lett volna rögtön átlátni.



37. ábra. A 14 (a) 15 (b) és 16 (c) szekvenciákra in silico kísérletek által prediktált hélixek

A munkát konformációs mintavételezéssel folytattuk, hogy lássuk a tervezett szekvenciák felveszik-e a programozott téralkatot *in silico*. Hibrid MC-MD metodikával és molekuláris erőtér alkalmazásával végeztük a modellezést, és ebben a fázisban nem alkalmaztunk kísérleti vagy egyéb konformációs megkötést. A **14** - **16**-ra kapott legalacsonyabb energiájú konformációs családok helikális szerkezetet mutattak. A **17** - **19** szekvenciáknak nyújtott gerincük volt, amit kanyar-típusú szegmensek alakítottak ki az alacsony energiájú konformációknál, de ezekből hiányzott a hosszútávú rend. A **14** - **16** láncoknál kiválasztott legalacsonyabb energiájú szerkezeteket tovább optimalizáltuk *ab initio* kvantumkémiai módszerekkel. A számítások megfelelően konvergáltak és új hélix-típusokat kaptunk eredményül. A **14** és **15** szekvenciáknál egy balmenetes (M) hélix-típust figyeltünk meg, amit egymásba ágyazott 14- és 16-tagú H-kötéses gyűrűk stabilizáltak (37a ábra). Ezt H14/16 hélixnek neveztük el. A  $\beta^3$ -aminosav egységeket is tartalmazó **15** a töltött oldalláncokat térközelbe tudta pozícionálni, és az így kialakuló sóhíd hozzájárulhatott a hélix stabilitásához

(37b ábra). A **16** láncra kapott balmenetes (M) hélixet egymás után következő 9-, 10-, 11- és 12-tagú H-kötéses gyűrűk tették merevvé (37c ábra). Bár ez a hélix addig nem látott komplexitással rendelkezett a H-kötés hálózatban, a peptid kötések alternáló orientációt mutattak, és ezt H9-12 hélixnek neveztük el.



**2. táblázat.** A hozzárendelt NOE kölcsönhatások száma a vizsgált szekvenciákra (CD<sub>3</sub>OH és DMSO-*d*<sub>6</sub>)

NOE típus	15	16	18	19
intra	27	21	3	9
i - i+1	19	16	7	9
i - i+2	5	6	0	0
i - i+3	4	5	0	1

**38. ábra.** Az amid protonok kémiai eltolódásának hőmérsékletfüggése DMSO- $d_6$ -ban mérve. Panel (a): **15** (fekete), **16** (szürke), és panel (b): **18** (fekete), **19** (szürke).

Valamennyi lánc a sztereokémiai programnak megfelelő másodlagos szerkezetet mutatott a modellezések alapján, így a **15**, **16**, **18** és **19** szekvenciákat megszintetizáltuk, és tisztítás után LC-MS módszerrel karakterizáltuk. Az NMR méréseket CD<sub>3</sub>OH, DMSO- $d_6$  és vizes oldatban (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 90:10) végeztük el. A jeldiszperzió jónak bizonyult **15** és **16** esetén jelkiszélesedést nem észleltünk. A gerinc-szignálok hozzárendelését 277 K-en hajtottuk végre, ahol a jelek feloldottságát a legjobbnak találtuk. A **18** és **19** láncok esetén a jeldiszperzió sokkal rosszabb volt, különösen a C<sup>α</sup>H and C<sup>β</sup>H régiókban és alacsonyabb hőmérsékleteken is. Ez a periodikus szerkezetek hiányára utalt és a jelhozzárendelés csak részlegesen sikerült. A másodlagos szerkezetek relatív stabilitását az amid protonok DMSO- $d_6$ –ban mért

hőmérsékletfüggésével ( $\Delta\delta \Delta T^{-1}$ ) ellenőriztük. A **15** szerkezetre a legtöbb esetben -5 ppb K<sup>-1</sup> feletti értékeket kaptunk és a legkisebb abszolút értékű hőmérsékletfüggést a szekvencia közepén (-3.86 ppb K<sup>-1</sup>, NH<sub>5</sub>) tapasztaltunk, ami már jelentős oldószertől való árnyékolást mutatott (38a ábra). Ehhez képest az azonos konstituciójú, de aperiodikus sztereokémiai mintázatú **18** jórészt -5 ppb K<sup>-1</sup> alatti értékeket adott, jelezve a megbontott térkémiai mintázat szerkezetromboló hatását. Ez alól a NH<sub>4</sub> volt kivétel, ahol a  $\Delta\delta \Delta T^{-1}$  érték növekedett **18** esetén **15**-höz hasonlítva. Ebben a viselkedésben közrejátszhat a Lys oldallánc közelsége, ami H-kötés akceptorként működhetett. Jól árnyékolt amid protonokat találtunk **16** esetén, a legtöbb érték jóval -5 ppb K<sup>-1</sup> felett volt, a szekvencia közepén -3 ppb K<sup>-1</sup> feletti adatot is mértünk (38b ábra). Ez a mintázat felborult a kontroll **19** szekvenciánál, jellemzően a hőmérséklet-függés növekedését tapasztaltuk, kivéve a NH<sub>3</sub> és a NH<sub>10</sub> esetén, ahol lehetséges, hogy a módosított szekvenciában kanyar struktúrák alakulhattak ki.



**39.** ábra. Diagnosztikus távolható NOE kölcsönhatások **15** és **16** esetén.

A ROESY spektrumok kiértékelése számos távolható i - i+2 és i - i+3 NOE kölcsönhatást fedett fel 15 és 16 esetén, míg 18 és 19-re jellemzően csak monomeregységeken belüli és NOE-kal találkoztunk (2. táblázat és szekvenciális 39. ábra). А szerkezetfinomításokat a távolsági kényszerekkel és a hibrid MC-MD technikát alkalmazva végeztük el. Az eredményül kapott 10<sup>4</sup> szerkezet klaszter vizsgálata két konformációs családot mutatott 15-re (39a és b ábrák). Mindkettő megfelelt a H14/16 geometriának és egyaránt alacsony energiájúak voltak, valamint a megkötéseket jól teljesítették (RMSV = 0,003 Å). A különbség a C-terminális pozíciójában mutatkozott, mert a terminális amid H-kötést tud

kialakítani a  $\beta$ -hAsp oldalláncával. A helikális szerkezettel összhangban az NH-C<sup> $\beta$ </sup>H és az NH-C<sup> $\alpha$ </sup>H vicinális csatolások egyöntetűen nagyobbak voltak, mint 8,5 Hz.



**40. ábra.** Az NMR szerkezetfinomítás után kapott tíz legalacsonyabb energiájú szerkezet: **15**, 1. klaszter (a); **15**, 2. klaszter (b); **16** (c); **18** (d); **19** (e).

A 16 láncra egyetlen konformációs családot találtunk (40c ábra), ami megfelelt a H9-12 hélixnek és jól összevágott a kísérletes távolsági megkötésekkel (RMSV = 0,010 Å). Az  ${}^{3}J(\text{NH-C}^{\beta}\text{H})$  csatolások a  $\beta$ -aminosavegységeknél nagyobbak voltak, mint 9,0 Hz, míg a  ${}^{3}J(\text{NH-C}^{\alpha}\text{H})$  értékek  $\alpha$ -aminosavegységekre 7,5 Hz körül voltak. Ez teljes összhangban áll a H9-12 hélix geometriával, mert a NH-C<sup> $\alpha$ </sup>H torziók az  $\alpha$ -aminosavegységekben kisebbek, mint a NH-C<sup> $\beta$ </sup>H torziók a  $\beta$ -aminosavegységekben. A szerkezetekkel összhangban nem álló NOE kölcsönhatásokat nem figyeltünk meg, és a tíz legalacsonyabb energiájú szerkezet által prediktált kölcsönhatásokat megtaláltuk a ROESY spektrumokban.

A **18** kontroll vegyületre kapott szerkezetek nem mutattak reguláris másodlagos szerkezeti elemeket (40d ábra). A **19** szekvenciánál tapasztalt egyetlen i - i+3 NOE (NH<sub>9</sub> - C<sub>α</sub>H<sub>6</sub>) kölcsönhatás egy hurok-szerű struktúrát eredményezett (40e ábra). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a kontroll szekvenciákon végzett szerkezetfinomítás eredményét a többi, jelentős flexibilitásra utaló eredmény figyelembevételével és így kritikával kell kezelnünk.



**41. ábra.** ECD görbék szobahőmérsékleten, metanolban (vastag) és vízben (vékony) mérve. A helikálisra tervezett **15** (a) és **16** (b) szekvenciákra kapott adatokat folytonos vonallal, a kontroll **18** (a) és **19** (b) láncokat szaggatott vonallal jelöltük.

Az ECD méréseket szobahón és az NMR kísérletek körülményeinek megfelelően 277 Ken végeztük. Lényegi eltérést nem tapasztaltunk eltekintve attól, hogy a hűtött mérésekben kissé megnövekedett a Cotton effektus a **15** és **16** láncokra (41. ábra). A **15**-re metanolban kapott Cotton effektus **18** esetén előjelet váltott és 215 nm-ről 205 nm környékére tolódott. Sajnos a foldamerek esetén az ECD görbék szerkezetfüggése sokkal kevésbé felderített, de az eltérő görbék mindenképp jelentős strukturális változást jeleztek a megbontott sztereokémiai mintázat hatására. Hasonlóan alapvető változást tapasztaltunk a metanolban felvett ECD görbékben **16** és **19** esetén; a Cotton effektus előjelet váltott és kisebb tolódást is láthattunk a hullámhosszban. A vízben felvett ECD spektrumok azt jelezték, hogy **16** H9-12 hélixe részlegesen vízben is megmaradt, mert a görbék lefutása nem változott, de a spektrum csökkent intenzitást mutatott. Jelentősebb relatív intenzitás csökkenést tapasztaltunk **15** H14/16 hélixénél a vizes közeg hatására, de itt is felismerhettük a hasonló lefutást. A kontroll szekvenciák vízre relatíve érzékenyebbnek mutatkoztak, mint a kiindulási helikális struktúrák, ami megerősíti a stabilis kompakt szerkezet hiányát.

Ezek az eredmények megerősítik azt a feltételezést, hogy a homokirális és az alternáló heterokirális rendszerek nem fedik le a periodikus másodlagos szerkezetek létrehozásának valamennyi lehetőségét. A 4.4.1 fejezetben lefektetett szabályok alkalmazásával a sztereokémiai mintázat hosszabb távon kiterjeszthető a szekvenciára és a gerinc tekeredésének valódi programozása így lehetővé válik. Ezek szerint a sztereokémiai információ, mint egy bináris adatfolyam kódolja a térbeli szerkezetet és a peptid lánc egy analóg számítógépként végrehajtja azt, kimenetként pedig a kívánt másodlagos szerkezetet adja.

# 4.1.6 Az általánosított sztereokémiai programozás alkalmazása: új αβ és ααββ foldamerek [7]

Az eddigi eredményekből kitűnik, hogy a sikeres foldamer tervezéshez nem kell a térkémiai megkötést a peptid gerinc minden pozíciójába beépíteni, de fontos kérdés, hogy ez a feltétel meddig lazítható. A 4.1.5 fejezetben jellemzett struktúrákban minden harmadik monomeregység rendelkezett egy szabad orientációval. A továbbiakban olyan α,β-peptid szabásmintákat készítettünk, amelyekben ez az arány úgy módosul, hogy két monomeregységenkét marad egy torzió szabadon az a-aminosavegységek jelenléte miatt. Továbbá a kötetlen torzió pozíciójának mintázatát is megváltoztattuk, és így születtek meg a tesztelni kívánt αβ- és ααββ-peptid szekvenciák. Fontos megjegyezni, hogy ezekben a struktúrákban a nagyobb α-aminosav arány gazdagabb felszíni diverzitást is lehetővé tett. A tervezést, az anyagok szintézisét és jellemzését a növekvő érdeklődés okán nemzetközi együttműködésben végeztük (Prof. Oliver Reiser, Universität Regensburg). Az új szekvenciák terveit a 42. ábrán mutatom be és ezekből látható, hogy ezúttal a peptidkötések orientációját alternálóra kívántuk beállítani, hogy a gerinc maradék flexibilitásának aránya és mintázata maradjon csak változó paraméter. A szekvenciákat nonamer és tridekamer hosszúságban állítottuk elő úgy, hogy a lánchossz ne akadályozza a szerkezetek kialakulását. Az αβ-peptidek (20 - 23) (15,2R)-ACPC és L-α-aminosav egységeket tartalmaztak a sztereokémiai mintázatnak megfelelően. Az aaß-peptidekben (15,2R)-ACPC, (15,2R)-ACPC, L-a-aminosav és D-aaminosav építőelemeket is felhasználtunk. Bizonyos pozíciókba telítetlen cisz-ACPC oldalláncot helyeztünk el az NMR jeldiszperzió javításának érdekében.

Valamennyi peptidet sikeresen előállítottuk Fmoc kémiával, HPLC-vel tisztítottuk és LC-MS módszerrel karakterizáltunk. Ebben a munkában először ECD spektroszkópiával ellenőriztük a rendezett szerkezetek esetleges jelenlétét, különös tekintettel az oldószerfüggő változásokra (metanol, víz illetve puffer, 43. ábra). Szembetűnő, hogy a hosszabb láncokra kapott görbék normált intenzitásai nagyobbak, mint a rövid analógoké (**20** vs. **21**, **22** vs. **23**, és **27** vs. **24** - **26**). Ez azt jelzi, hogy lánchossz javítja a konformációs stabilitást, ami a rendezett periodikus struktúrák jellemzője. Általában megfigyelhető, hogy a metanolos közegű intenzitások nagyobbak, mint a vízben vagy pufferben felvett görbék esetén, kivéve **24**. Érdekes megfigyelni, hogy a **20** - **23** szekvenciákkal ellentétben a **24** - **27** sorozat intenzív jeleket adott vizes közegben is. A **25** vegyület kivételével a görbék intenzitása megnőtt a pufferelt közegben, azonban ennél a vegyületnél nagyon rossz oldhatóságot tapasztaltunk, ami magyarázza az alacsony intenzitásokat. Az  $\alpha\beta$ -peptid sorozatnál karakterisztikus az intenzív maximum 200 nm környékén, ugyanakkor az  $\alpha\alpha\beta\beta$ -peptideknél közel szimmetrikus Cotton effektusokat kaptunk 205 nm környékén a pozitív sávval és 190 nm körül a negatív sávval.



**42. ábra.** A *de novo* tervezett  $\alpha\beta$ - és  $\alpha\alpha\beta\beta$ -peptid szekvenciák (**14-16**) és a kvázi-random ellenőrző láncok (**17-19**). A tervezés a [ $\phi,\psi$ ] szögek előjele és a sztereokémiai mintázatok alapján történt a 4.1.1 fejezetben leírt elvek alapján. Az oldalláncokat a szokásos egybetűs kódokkal jelöltük (hS: homo-szerin). A dőlt betűkkel a konfigurációkat CIP rendszerben adtuk meg úgy, hogy az oldalláncokat jelölő R = metil.



**43. ábra.** Az αβ- (**20-23**) és az ααββ-peptidekre (**24-27**) kapott ECD spektrumok. A görbéket szobahőn vettük fel és az intenzitások a kromofór koncentrációra normálva vannak. A puffer pH 7,4, 20 mM foszfát volt.

Az  $\alpha\beta$ -peptidek NMR spektrumai CD<sub>3</sub>OH-ban jó jelfeloldottságot mutattak, szinte valamennyi jelet hozzá tudtuk rendelni. Az amid protonok kémiai eltolódásának hőmérsékletfüggése jól mutatta a gerinc H-kötéseinek árnyékoló hatását. Különösen alacsony abszolút értékeket kaptunk a 22 szekvencia 3-11 egységeire (-1,08 - -4,38 ppb/K). Jelgazdag ROESY spektrumokat találtunk a 20 és 22 tridekamerekre, amely számos távolható NOE kölcsöhatást is tartalmazott. A szokásos szekvenciális NH<sub>i</sub>-C<sup>α</sup>H<sub>i-1</sub> NOE-k mellett távolható  $NH_{i+4}$ -C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>i</sub> kölcsönhatásokat találtunk az  $\alpha$ -aminosavegységekre és  $NH_i$ -C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>i+4</sub> kontaktokat figyeltünk meg a β-aminosav építőelemeknél (44a ábra). Továbbá a vicinális csatolások a βaminosav amid protonoknál a 8,4–9,4 Hz tartományba estek, míg ezek az αaminosavegységeknél a 7,3-7,8 Hz tartományban voltak (terminális aminosavakat figyelmen kívül hagyva). Ezek a megfigyelések és a jó NMR jeldiszperzió alátámasztották a szekvenciák önrendeződését. Az NMR távolsági megkötésekkel végrehajtott szerkezetfinomítás jól meghatározott szerkezethez vezetett, ami az irodalomban addig ismeretlen jobbmenetes (P) H16/18 hélix geometriát adott (45. ábra). A létrehozás időpontjában ez volt a legnagyobb átmérőjű peptid foldamer. Érdekes továbbá az is, hogy a nyújtott konformációban lévő αaminosavegységek ( $\psi = -176^\circ$ ,  $\phi = -129^\circ$ ) ebben az elrendezésben  $\beta$ -redők alkotóelemei szoktak lenni.



**44. ábra.** A ROESY spektrumokban megfigyelt távolható kölcsönhatások **20** (a) és **27** (b) szekvenciák esetén.

Az  $\alpha\alpha\beta\beta$ -peptideket (**24 – 27**) CD<sub>3</sub>OH-ban, DMSO-*d*<sub>6</sub>–ban és vizes pufferben mértük (pH 7,4, 20 mM foszfát + 10% D<sub>2</sub>O). A jeldiszperziót nagyon jónak találtuk, a jelhozzárendelést majdnem teljes mértékben el tudtuk végezni. Az amid protonok kémiai eltolódásának hőmérsékleti koefficiense jellemzően alacsony abszolút értékeket mutatott szerves oldószerekben, különösen igaz ez a lánc közepén lévő aminosavegységekre (> -5 ppb/K). Ez összevetve az eddigi ismereteinkkel a feltekeredett másodlagos szerkezet kialakulását jelezte. Vizes közegben a hőmérsékleti koefficiensek meghatározása négy szignál esetén nehézségekbe ütközött bizonyos jelátfedések miatt, de megállapíthattuk hogy az amid protononok ebben a közegben is árnyékolva voltak.

A jelgazdag ROESY spektrumokban  $C^{\beta}H_i - C^{\alpha}H_{i+2}$  NOE kölcsönhatásokat figyeltünk meg a gerincben (44b ábra). A láncközi Val és Ala oldalláncok esetén C<sup>y</sup>H<sub>i</sub> – C<sup>α</sup>H<sub>i+2</sub> kontaktokat is be tudtunk azonosítani. A gerinc amid protonok között pedig i - i+1 kölcsönhatásokat detektáltunk. Ezek alátámasztották a kompakt helikális struktúra jelenlétét a 24 – 27 szekvenciákra. A N-terminális α-aminosavegységek esetén ezeket a távolható kölcsönhatásokat nem figyeltük meg, ami a jelentős flexibilitásukra utalt. А szerkezetfinomítást sikeresen elvégeztük 24, 26 és 27 szekvenciákra a metanolban és a vízben kapott NMR adathalmazokkal is. A kvantitatív elemzés 25 esetén nem volt sikeres, mert a peptid aggregációt mutatott és a spektrumok zajosak voltak, de a diagnosztikus távolható kölcsönhatásokat ott is megfigyeltük.

dc\_335\_11



45. ábra. Az NMR szerkezetfinomítás után kapott öt legalacsonyabb energiájú szerkezet (a és c)
20 szekvencia esetén. A feltekeredés grafikus reprezentációja (b és d). Az átláthatóság érdekében a H-atomokat nem ábrázoltuk.



46. ábra. A 27 vegyület oldatfázisú szerkezete metanolban (a és c) illetve vízben (b és d).

A számítások egy jobbmenetes (P) hélix típust eredményeztek, amit egymásba illeszkedő 9/12/9/10-tagú H-kötéses gyűrűk stabilizálnak (46. ábra). A **27** vegyületnél különbséget tapasztaltunk a vizes közegű és a metanolos szerkezet között. Vízben a struktúra némi kompressziót szenved, és ezt a 2, 6 és 10 pozíciókban lévő ACPC gyűrűk közötti hidrofób kölcsönhatások maximalizálása és a Lys<sup>10</sup> - Glu<sup>12</sup> sóhíd kialakulása hajtja.

A 24 láncnál egy gyenge  $C_aH_1-C_aH_4$  NOE kölcsönhatást figyeltünk meg, ami nem vág össze a javasolt hélix geometriával. Erre az egyik lehetséges magyarázat az, hogy egy másik minor konformer populáció lehet jelen, amelyben az N-terminális negyedik  $\alpha$ -proton térközelbe kerül egymással. Ezt alátámasztja a 24-re kapott ECD görbék oldószerfüggése is, mivel ez a jel csak metanolban volt megfigyelhető.

Összefogalva a fenti eredményeket kijelenthetjük, hogy a sztereokémiai programozás elve alkalmazható még akkor is, ha csökkentjük a megkötött torziók számát. Ezzel a módszerrel sikeresen alkottunk új másodlagos foldamer struktúrákat, a H16/18 és a H9/12/9/10 hélixet. Mindkettőben magas az  $\alpha$ -aminosavak aránya, mégis készségesen vesznek fel kompakt térszerkezetet rövid lánchosszon is, amely az eddig megfigyelt  $\alpha\beta$ -hélixekről nem mondható el. Sőt a H9/12/9/10 hélix esetében vizes közegű szerkezetfinomítást is tudtunk végezni, ami ezeket a szerkezeteket egyedivé teszi ebben az osztályban. A új hélixek további előnye, hogy kézenfekvő módon lehet az  $\alpha$ -aminosavakkal diverz felszíni kémiát kialakítani.

#### 4.2 Oldalláncok alakjának hatása a másodlagos szerkezetre

#### 4.2.1 A H12 hélix stabilizálása oldalláncok sztérikus kölcsönhatásának segítségével [8]

A 4.1 fejezetben bemutatott eredmények erősen fókuszálnak a gerincben sztereokémiai eszközökkel irányított másodlagos szerkezetekre. Meg kell azonban jegyezni, hogy a térkémiai programozás elve a szükséges geometriai feltételeket szabja meg a hélixek és a szálak kialakításához. Nem veszi viszont figyelembe az oldalláncok közötti kölcsönhatásokat, a terminálisok nukleáló hatását vagy az oldószer potenciális rendező hatását. Ebben a fejezetben szeretném leírni azokat a vizsgálatainkat, amelyek célzottan az oldalláncok alakját használták ki a hélixek geometriájának szabályzásához. Azt tűztük ki célul, hogy új utat találjunk a homokirális β-peptid H12 hélix stabilizálására, mert ennek a hélix-típusnak a létrehozásához meglehetősen szűk eszköztár állt rendelkezésre. A H12 hélixet, mint ahogy a 2.2.1 fejezetben hivatkoztam rá, csak transz-ACPC monomerekkel vagy azzal analóg öttagú oldallánccal tudták eddig létrehozni. A hattagú oldalláncok már a H14 hélix képződését segítették elő. A H14 hélixben az i - i+3 helyzetben lévő oldalláncok egymással pontosan fedésben vannak, ezért közöttük jó az illeszkedés és szolvofób vagy ionos kölcsönhatások alakulhatnak ki, ami hozzájárul a H14 hélix stabilitásához. Elképzelésünk az volt, hogy ezt a szoros kontaktust nagy térkitöltésű oldalláncokkal meg lehetne bontani, így a sztérikus taszítás a H14 hélixet relatíve destabilizálná, míg a H12 hélix potenciálisan kialakulhatna. Erre a célra

egy monoterpén-származék  $\beta$ -aminosavat választottunk (47. ábra), aminek biciklusos (apopinán) alapváza van: 2-amino-6,6-dimetil-biciclo[3.1.1]heptán-3-karbonsav (ABHC).<sup>182</sup> Ez az építőelem felfogható az ACHC egy metilén-áthidalt, dimetil-szubsztituált analógjának, ami a rigidsége miatt bizonyosan javítja a peptidlánc önrendeződési hajlamát, viszont a nagy térigényű oldalláncok elkerülik a H14 hélixben kialakuló i – i+3 fedőállásokat.



**47. ábra.** Sztérikus kölcsönhatások az i – i+3 helyzetben lévő oldalláncok között egy ideális H14 hélixben ACHC-ra (nincs ütközés) és ABHC-ra (valószínű ütközés).

Ennek a hipotézisnek a tesztelésére *transz*-(1R,2R,3R,5R)-ABHC homoligomereket konstruáltunk (48. ábra), és hibrid MC-MD módszerrel konformációs mintavételezést hajtottunk végre a **31** szekvencián (49a ábra). A legalacsonyabb energiájú konformációs család a H12 hélix volt (a konformerek 32 %-a). Érdekes, hogy a H16 hélix is betöltött volt (konformerek 21%-a), de a konformációs energiát magasabbnak találtuk. A H14 hélix esetén nagyon alacsony arányt találtunk (konformerek 0.3%-a). Részlegesen feltekeredett struktúrákat is megjelentek, amelyekben 12-tagú és a 16-tagú H-kötéses gyűrűk egyaránt előfordultak (konformerek 21%-a). Más helikális szerkezetet nem találtunk.



28, n = 1; 29, n = 2; 30, n = 3, 31, n = 4
48. ábra. A vizsgált *transz*-ABHC homoligomerek

Valamennyi, a **28-31** vegyületre geometriailag lehetséges hélixet (H8, H10, H12, H14 és H16) *ab initio* kvantumkémiai módszerekkel HF/3-21G//B3LYP/6-311G\*\* elméleti szinten optimalizáltunk vákuumban (49b ábra). A számítások megfelelően konvergáltak a potenciális

energia felület megfelelő minimumaihoz, kivéve a H10 hélix kiindulási szerkezetet, ami átfordult H14 hélixbe.



**49. ábra.** A **31** láncra végzett MC-MD konformációs mintavételezésben kapott klaszterek (a) (RMSD: átlagos négyzetes koordináta eltérés gyöke). A konformációs energiákat és az RMSD értékeket a legalacsonyabb energiájú szerkezethez képest számítottuk. A relatív B3LYP/6-311G\*\* energiák **28** (◊), **29** (□), **30** (Δ) és **31** (○) esetén (b).

A kvantumkémiai szinten végzett számítások is azt jelezték, hogy a H12 és a H16 hélixek a legvalószínűbb másodlagos szerkezetek már pentamer hosszúságtól (**30** és **31**). A **28** és **29** láncokra H8 hélix adódott a legalacsonyabb energiájúnak. Megjegyezzük, hogy a végső *ab initio* H12 hélix geometriákban az N-terminális aminosavegységnél 6-tagú H-kötéses gyűrűt tapasztaltunk, de ezt a későbbi kísérleti eredmények nem támasztották alá. Az *in silico* kísérletek igazolták a sztérikus oldallánc taszítással történő hélixformálásának lehetőségét.



**50. ábra.** Az NH/ND kicserélódés időfüggése **31**-re CD<sub>3</sub>OD-ban, \* : NH<sub>2</sub>; ○ : NH<sub>3</sub>; ▲ : NH<sub>4</sub>; ■ : NH<sub>5</sub>; x : NH<sub>6</sub>.

Ezek alapján megszintetizáltuk a 28 - 31 láncokat és LC-MS karakterizálás után NMR vizsgálatoknak vetettük alá. A méréseket 4 mM-ban CD<sub>3</sub>OH and DMSO-*d*<sub>6</sub> oldószerekben végeztük. A jeldiszperzió jó volt, kiszélesedést nem észleltünk, így a jelhozzárendelést sikeresen végrehajtottuk. Az oldalláncok erősen hidrofób jellege miatt vizes közegben nem tudtunk mérni. Az amid protonok cseresebességét direkt mérésekkel követtük. Az adatok a 31 szekvenciára azt mutatták, hogy az N- és C-terminálisok kivételével a jelek hosszan megfigyelhetőek voltak. A cseresebesség mintázata jó összhangot mutatott a H12 hélix H-kötés hálózatával. A 30 lánc esetében hasonló görbéket észleltünk, de ott a cseresebesség jelentősen gyorsabb volt, ami kevésbé rendezett szerkezetre utalt.



**51.** ábra. A DMSO- $d_6$ -ban **31** szekvencia által mutatott távolható NOE kölcsönhatások.



**52. ábra.** A szerkezetfinomítás után kapott H12 hélix oldal (a) és felül (b) nézete a **31** vegyületre. A nyilak a szekvenciára jellemző  $Me_i NH_{i+3}$  térközelségeket mutatják.

A ROESY spektrumokat CD<sub>3</sub>OH és DMSO-*d*<sub>6</sub>-ban vettük fel. A **31** vegyület DMSO-*d*<sub>6</sub>ban a C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>*i*</sub> - C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>*i*+2</sub>, C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>*i*</sub> - NH<sub>*i*+2</sub> és Me<sub>*i*</sub> - NH<sub>*i*+3</sub> távolható NOE kölcsönhatásokat mutatott amelyek egyértelműen alátámasztják a prediktált H12 hélix szerkezetet (51. ábra). A távolsági megkötésekkel végzett szerkezetfinomítás a H12 hélixet adta eredményül mint predomináns konformációt (52. ábra). Az axiális metilek és az amidok közötti NOE kölcsönhatások specifikus mintázatot mutattak, ami nem lenne így, ha hélix-hélix laterális asszociációtól származnának a jelek (ld. DOSY eredményeket alább). A CD<sub>3</sub>OH esetében ugyan számos

karakterisztikus távolható kölcsönhatást megfigyeltünk, néhány a C<sup>§</sup>H<sub>24</sub> jeleket érintő ROESY keresztcsúcsot nem azonosítottunk ezek átfedése miatt. Nem tudtuk hozzárendelni a C<sup>§</sup>H<sub>1</sub>-NH<sub>3</sub> kölcsönhatást sem, ezzel szemben mindkét oldószerben látható volt egy gyenge C<sup>§</sup>H<sub>1</sub>-NH<sub>4</sub> keresztcsúcs, ami teljes összhangban állt a H12 hélixszel. A **30** szekvencia spektrumaiban szintén megfigyeltük a H12 hélixre jellemző NOE kölcsönhatásokat, de **28** és **29** esetén nem találtunk rendezett szerkezetre utaló jeleket. A **30** és **31** láncokra mért skaláris csatolások az amid protonoknál jóval 8,5 Hz fölött voltak, alátámasztva ezzel az antiperiplanáris NH-C<sup>§</sup>H torziót, ami a H12 kialakulásának feltétele. Ez alól az N-terminális egység kivételt képez. Ezek a vicinális csatolások jelentősen csökkentek a **29** szekvenciában, míg **28** esetén a csatolásokból inkább rendezetlen konformációra következtethettünk.



52. ábra. A metanolban felvett ECD görbék a 28 (vékony szürke), 29 (vékony fekete), 30 (vastag szürke) és 31 (vastag fekete) vegyületekre.

Az ECD méréseket metanolban végeztük (DMSO erre a célra nem alkalmas, vízben pedig oldhatósági problémákat tapasztaltunk). A görbék jelentős lánchossz-függést mutattak (52. ábra). A Cotton effektus pozitív sávja 220 nm-nél jelent meg **28** és **29** esetén, míg **30** és **31** rendre 210 nm és 205 nm körül adott maximumokat. A negatív sáv konstans maradt 195 nm-nél. A pozitív sávokra megfigyelt monoton kék-eltolódás és az effektus növekvő szimmetriája jól alátámasztja azt a feltételezést, hogy a rendeződés lánchossz-függő módon zajlik, ami a hélixképződés lényegi sajátsága. A **28** és **29** láncoknál megfigyelt intenzívebb negatív sáv az alacsonyabb hullámhosszaknál jelezheti a nyújtottabb geometriák jelenlétét, mint pl. a H8 hélix.

Mivel a **31** vegyület esetén metanolban tapasztalt NMR mérési nehézségek és a rendkívül lassú NH/ND csere felvetették a hélixek közötti asszociáció lehetőségét, DOSY NMR mérésekkel vizsgáltuk ennek jelenlétét. A 3. táblázatban megadott adatokból kitűnik, hogy az önasszociáció egy fontos jellemzője ezeknek az erősen hidrofób oldalláncokból felépülő hélixeknek.

	Számolt térfogat	Számolt sugár	Diffúziós együttható	Mért sugár	Aggregációs szám
Vegyület	$Å^3$	Å	$x10^{-9} m^2 s^{-1}$	Å	
glükózª	506,83	4,95	2,08	_b	1
30	2140,14	7,99	0,63	16,4	8,6
31	2513,36	8,43	0,51	20,3	13,9

3.	táblázat. A	metanolban	DOSY	NMR-rel	meghatározott	aggregációs	számok

<sup>a</sup> külső referencia, <sup>b</sup> nem alkalmazható

Ezek az eredmények megerősítik azt a feltételezésünket, hogy a nagy térkitöltésű oldalláncok közötti taszítással át lehet terelni a geometriát az általunk kívánt hélix-típusba úgy, hogy destabilizáljuk a kiindulási hélix oldallánc elrendezést a ciklusos oldallánc preorganizáló hatásának elvesztése nélkül. A foldamerek körében ez volt az első ilyen próbálkozás és jelen esetben a H12 hélix stabilizálását sikerült elérnünk biciklusos β-aminosavakkal. Az elméleti számítások során érdekes volt megfigyelni, hogy a rendszer nemcsak úgy képes geometriailag elkerülni a H14 hélix kialakulását, hogy a kisebb átmérőjű H12 hélixbe tekeredik át, hanem elvi lehetőségét láttuk a nagyobb átmérőjű H16 hélix kialakulásának. Ennek a jelenségnek a további vizsgálatát a 4.3 fejezetben mutatom be.

#### 4.2.2 Az oldallácok alakjának hatása a H10/12 hélix stabilitására [9]

A β-peptid H10/12 hélix stabilizálását sikerrel oldottuk meg a sztereokémiai programozás elvének alkalmazásával. Így az alternáló módon kapcsolt *cisz*-ACPC enantiomerek elérték a kívánt hatást. Jól ismert jelenség, hogy a homokirális hélixeknél az öttagú oldalláncok (ACPC) a H12 kialakulását segítik elő, míg a hattagú oldalláncok (ACHC) a H14 hélixet stabilizálják (2.2.1 fejezet). Azonban eddig nem tanulmányozták, hogy az egészen egyedi H10/12 hélix esetén a gyűrű tagszámának bővítése vagy egyéb változtatások az oldalláncok topológiájában hogyan befolyásolják a szerkezet kialakulását. Ebben a munkában azt vizsgáltuk, hogy adott sztereokémiai mintázat mellett a H10/12 hélix hogyan képes tolerálni a hattagú aliciklusos oldalláncokat. Enantiomertiszta *cisz*-(1*R*,2*S*)-ACHEC, *cisz*-(1*S*,2*R*)-ACHEC, *cisz*-(1*R*,2*S*)-ACHEC (2-aminociklohex-3-én-karbonsav) és *cisz*-(1*S*,2*R*)-ACHEC építőelemeket használtunk (53. ábra). Továbbá metilén-áthidalt ciklohexén oldalláncokkal is felépítettük a struktúrát *diexo*-(3*S*,4*R*)-ABHEC és *diexo*-(3*R*,4*S*)-ABHEC (3-aminobiciklo[2.2.1]hept-5-én-2-karbonsav) monomerek segítségével.

A szintézist Fmoc kémiával végeztük és a szokásos tisztítási eljárás után LC-MS-sel jellemeztük az anyagokat. NMR méréseket 4 mM koncentrációban CD<sub>3</sub>OH, DMSO- $d_6$ , és vízben (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 90:10) végeztünk. A jeldiszperzió a legtöbb szekvenciára jó volt, jelkiszélesedést nem észleltünk és a rezonanciák hozzárendelését problémamentesen hajtottuk végre. Kivétel volt a **33** vegyület, melynél minden alkalmazott oldószerben jelkiszélesedést tapasztaltunk. A mintát 245 K-re hűtve CDCl<sub>3</sub> –ban két jelhalmazt sikerült kifagyasztani, és a

major jelcsoportra már el tudtuk végezni a hozzárendelést. Ez a megfigyelés azt támasztja alá, hogy **33** két stabilis konformációval rendelkezik, amelyek egymással kicserélődésben vannak.



**53. ábra.** A vizsgált alternáló heterokirális gerinccel és hattagú oldalláncokkal felépített szekvenciák (**32-37**). A korábban vizsgált öttagú oldalláncokat összehasonlításképpen tüntettük fel.

Ami az NH/ND kicserélődést illeti, a hexamer szekvenciák lassú cserélődést mutattak. A láncközi protonok még egy óra múlva is 30 - 40%-os jelintenzitást produkáltak, míg természetesen a láncvégi amidok cseréje azonnali volt. Ez a megfigyelés azt jelezte, hogy önrendeződés ment végbe. Érdekes, hogy az egymással kicserélődő két konformert adó **33** sem lógott ki a sorból, ami arra utalt, hogy a geometriák teljes kitekeredés nélkül alakulhattak egymásba. A tetramereknél gyorsabb cserét figyeltünk meg, 40 perc után a jeleket teljesen elvesztettük, ami összhangban állt a lánhossz-függő szerkezetformálással.

Az ECD ujjlenyomatok metanolban **33** és **35** esetén nagyon hasonló viselkedést mutattak 7-hez, amit korábban H10/12 hélixként azonosítottunk, bár a jelintenzitások kissé alacsonyabbak voltak (54. ábra). Vízben oldhatósági problémák és a fényszóródás miatt **33** nem adott értékelhető ECD spektrumot. A **35** szekvenciánál vízben hasonló görbét kaptunk, mint metanolban, de fele akkora intenzitással, ami azt jelzi, hogy a szerkezet vizes oldószerben is részlegesen megmaradt. A **37** esetén 215 nm környékén kaptunk minimumot és 200 nm környékén maximumot. Ez a jelentős eltérés a H10/12 hélixre tipikus ECD görbétől és a korábban a szál szerkezetekre kapott spektrumoktól is, azt támasztotta alá, hogy **37** nem veszi fel a H12 hélix geometriát, de globális feltekeredése helicitást mutat. A vizes ECD görbéje 210 nm-nél adott minimumot és 190 nm-nél maximumot, és ez a jelentős eltérés a metanolos adatoktól oldószerre érzékeny struktúrát mutatott.





**54. ábra.** A **33** (piros), **35** (sötétkék) és **37** (fekete) láncok metanolban felvett ECD görbéi. Összehasonlításul feltüntettük a **7**-re kapott és tükörképi párra korrigált adatokat is (cián).



**55. ábra.** A **33** vegyületre talált távolható NOE kölcsönhatások (CDCl<sub>3</sub>, 245 K) (a). A **35** (b) és **37** (c) láncok által DMSO- $d_6$  és CD<sub>3</sub>OH oldószerekben mutatott kontaktok.

A részletes NMR vizsgálatok **33**-ra CDCl<sub>3</sub>-ban és 245 K hőmérsékleten történtek a fent említett kicserélődési jelenség miatt. A major konformációra a balmenetes H10/12 hélixre jellemző távolható NOE mintázatot kaptuk (55a. ábra): NH<sub>1</sub> - C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> - NH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub> -C<sup>β</sup>H<sub>5</sub> és C<sup>β</sup>H<sub>4</sub> - NH<sub>6</sub>. Az NMR távolsági megkötésekkel végrehajtott szerkezetfinomítás kétség nélkül a H10/12 hélix konformációt eredményezte (56a ábra). A legjobb szerkezetet *ab inito* kvantumkémiai szinten (RHF/3-21G és B3LYP/6-311G\*\*) is modelleztük és a szerkezet stabilisnak bizonyult. A minor konformer másodlagos szerkezetét nem tudtuk meghatározni az alacsony koncentrációja (~ 6 %) miatt. Az alacsony NH/ND cseresebesség azonban azt

jelzi, hogy a minor konformer és a H10/12 hélix valószínűleg teljes kitekeredés nélkül alakul át egymásba. Figyelembe véve a gerinc sztereokémiai mintázatát és az ezzel kapcsolatosan felhalmozott tapasztalatokat úgy véltük, hogy a minor konformernek is egy alternáló amidorientáltságú hélixnek kell lennie. A H10/12 hélixhez geometriában és energiában legközelebb a balmenetes H18/20 hélix van, és ebbe a konformációba a H10/12 hélix kitekeredés nélkül gyors H-kötés elcsúsztatással tud átrendeződni (56b ábra). A B3LYP/6-311G\*\* elméleti szinten végzett számítások ezt az elképzelést alátámasztották, mert a nagyátmérőjű hélix energiája csak 4 kcal mol<sup>-1</sup>-lal volt magasabban (vákuumban), mint a H10/12 hélixé.



**56. ábra.** A **33** láncra kapott H10/12 (a) és H18/20 (b) hélixek, valamint a **37** által mutatott cirkuláris konformáció (c). Az (a) és (c) konformációkat NMR szerkezetfinomítással, majd B3LYP/6-311G\*\* elméleti szinten végzett optimalizálással kaptuk. A (b) konformáció kizárólag elméleti számítás eredménye.

A **35** láncon CD<sub>3</sub>OH and DMSO-*d*<sub>6</sub>-ban végrehajtott ROESY mérések ebben az esetben is a balmenetes H10/12 hélixet támasztották alá (55b ábra). Ezt a következtetésünket a szerkezetfinomítási számítások megerősítették. Itt a kicserélődés nem zavarta a skaláris csatolások meghatározását és azt kaptuk, hogy azok a H10/12 hélixnek megfelelően periodikus mintázatot mutatnak: 9,8 Hz a NH<sub>3</sub> - C<sup>β</sup>H<sub>3</sub> és NH<sub>5</sub> - C<sup>β</sup>H<sub>5</sub>, illetve 8,7 Hz a NH<sub>2</sub> -C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub> - C<sup>β</sup>H<sub>4</sub> és NH<sub>6</sub> - C<sup>β</sup>H<sub>6</sub> csatolásokra. A **37** vegyület esetén hiányoztak az i – i+2 kölcsönhatások, ellenben szekvenciális, de jól meghatározott, a rigid oldalláncokat érintő NH<sub>i</sub> - C<sup>4</sup>H<sub>i</sub> és NH<sub>i</sub> - C<sup>1</sup>H<sub>i-1</sub> kölcsönhatás párokat találtunk (55c ábra). Ez kizárja a H10/12 hélix jelenlétét. Az amid protonok vicinális csatolásai nem mutattak periodikus mintázatot, valamennyi 8,5 Hz környékén volt. Mivel az oldalláncokra mutató NOE kölcsönhatások a szerkezetfinomítás szempontjából hasznosnak bizonyultak, így a számításokat végrehajtottuk. Eredményül egy cirkuláris geometriát kaptunk, amit 6-tagú, monomeregységeken belüli Hkötéses gyűrűk stabilizálnak (56c ábra). Ez összhangban áll a gerinc sztereokémiai mintázatával és egy nyújtott, szál-szerű konformáció esetén C<sup>7</sup>H<sub>i</sub>-C<sup>1</sup>H<sub>i-1</sub> és C<sup>7</sup>H<sub>i</sub>-C<sup>4</sup>H<sub>i+1</sub> NOE-kat kellett volna megfigyeljünk, de ezek jeleit nem találtuk a ROESY spektrumokban.

A bemutatott eredményekből arra következtethetünk, hogy a hattagú gyűrűs oldallánc ugyan képes kialakítani a H10/12 hélixet, de valószínű, hogy az ACHC gyűrűk által kialakított  $\theta$  szög nem ideális ennek a kis átmérőjű alternáló hélixnek. Ez abban nyilvánult meg, hogy **33** két egymással kicserélődő konformációt is felvett. Ezt a jelenséget nem tapasztaltuk az ACHEC oldalláncokkal, aminek az lehet az oka, hogy a telítetlen kötés az oldalláncban nagyobb szabadságot enged a  $\theta$  torziónak, így az alkalmazkodhat a H10/12 hélixhez. Elméleti számításokkal és az alátámasztó kísérleti adatok segítségével posztuláltuk az alternáló H18/20 hélix létezését. A teljesen merev ABHEC biciklusok viszont már megakadályozzák a gerinc spirális geometriájának kialakulását a  $\theta = 0^{\circ}$  miatt, így hélix nem alakulhat ki, de a gerinc körkörös futása megmarad. A *diexo*-ABHEC oligomerek hasonló viselkedését írták le.<sup>183</sup> Ezek a megfigyelések igazolják, hogy amíg a sztereokémiai mintázat hatékonyan programozza a peptidlánc globális tekeredését a  $\varphi$  és  $\psi$  torziókon keresztül, addig a konkrét másodlagos szerkezet finomhangolható az oldalláncok  $\theta$  torzióra kifejtett hatásával.

#### 4.3 Lánchossz-függő másodlagos szerkezetek

#### 4.3.1 Lánchossz-függő H10 -> H14 hélix átmenet megfigyelése [10]

A 4.2 fejezetben példákat láthattunk arra, hogy a másodlagos szerkezet hogyan idomul az oldallánc kölcsönhatásokhoz és a  $\theta$  torzió preferenciái hogyan finomhangolják a hélixek geometriáját és stabilitását. Emellett azonban a szekvenciák lánchossza és ezzel együtt az oldószernek is jelentős hatása lehet a másodlagos szerkezetre. A lánchossztól való függés vizsgálata minden foldamerekkel kapcsolatos munka fontos része, mivel a monomerek számával egyre stabilisabbá váló másodlagos szerkezetek fontos bizonyítékát jelentik az önrendeződés folyamatának. Továbbá ez egy lényeges jele annak, hogy a konformáció nem "túlprogramozott" és az önrendeződés egy valódi folyamat. Azért is érdekes ezt kiemelni, mert a biomimetikus viselkedéshez hozzátartozik a szerkezetek belső dinamikája és alkalmazkodóképessége. Biopolimereknél a rendezetlenből hélixbe<sup>184,185</sup> való és a hélix -> hélix<sup>186,187</sup> átmenet jól ismert folyamatok. Ezek nem egyszer a biológiai funkcióhoz szükségesek, mint pl. a 3<sub>10</sub>-hélix -> *a*-hélix átmenet a feszültség-függő ioncsatornák esetében.<sup>188</sup>

A 2.3.1 fejezetben hivatkoztam arra, hogy ez a fajta konformációs polimorfizmus megjelent az  $\alpha\beta$ -peptidek körében is. A  $\beta$ -peptidek esetében is meg kívántuk mutatni, hogy ez még a rendkívül erős preorganizációt biztosító ciklusos oldalláncok esetében is megfigyelhető. A 2.2.1 fejezetben idéztem, hogy a  $\beta$ -H14 hélixek *transz*-ACHC és  $\beta^3$ -aminosav építőelemekkel stabilizálhatók és ezt a konformációt már igen rövid lánchosszon fel is veszik a szerkezetek. A H14 hélix i – i+3 H-kötéssekkel stabilizálódik és ugyan a H10 hélix jelenlétét elméleti számítások alapján már felvetették egyensúlyban a H14 hélixszel,<sup>161</sup> azonos oldalláncokkal lánchosszfüggő módon nem sikerült a H10 -> H14 átmenetet kísérletesen

kimutatni. A célunk az volt, hogy *transz*-ACHC egységekkel felépített rövid láncoknál megfigyeljuk H10 jelenlétét, és felderítsük az ilyen láncok flexibilitásának határait.



**38**, n = 2; **39**, n = 3; **40**, n = 4; **41**, n = 5

57. ábra. A H10 -> H14 átmenet tanulmányozására előállított szekvenciák.



**58. ábra.** A H10 és H14 hélixek konformációs energiakülönbségének lánchosszfüggése (♦ RHF/3-21G, ▲ B3LYP/6-311G\*\*), és a reprezentatív *ab initio* geometriák.

A H10 hélix rövid lánchosszaknál való megfigyelését elméleti számításokkal modelleztük. A **39** - **41** láncokra (57. ábra) szimulált hűtés protokollal és a releváns H-kötéseknél távolsági kényszerfeltételekkel (külön H10 és H14-re) irányított konformációs keresést hajtottunk végre. Az így kapott struktúrákat tovább optimalizáltuk az RHF/3-21G szinten vákuumban, amelyek konvergáltak a megfelelő lokális energiaminimumokhoz. A konformációs energiákat B3LYP/6-311G\*\* szinten is kiszámítottuk. A H10 és H14 hélixek közötti energia különbség ( $\Delta E = E_{10}-E_{14}$ ) a másodlagos kötőerők és a hőmérsékleti mozgás energia skálájához viszonyítva nem mutatkozott nagynak (58. ábra). A  $\Delta E$  értékek azt a trendet mutatták, hogy a lánchossz csökkenésével a H10 hélix egyre stabilisabbá válik a H14 hélixhez képest. A

különböző elméleti szinten kapott eredmények az prediktálták, hogy **39** esetén  $\Delta E$  közelít nullához és esély lehet a H10 hélix jelenlétét oldatfázisban kimutatni.

A **38** – **41** szekvenciákat Boc kémiával és (1*S*,2*S*)-ACHC építőelemekből állítottuk elő. A kapcsolás nem volt problémamentes, így a harmadik monomertől savfluorid módszerrel végeztük a szintézist. A szokásos karakterizálás után NMR-rel végeztünk méréseket 8 mM CD<sub>3</sub>OD és DMSO-*d*<sub>6</sub> oldatokban. Az amid protonok cseresebességét direkt mérésekkel ellenőriztük. A **38** vegyületre azonnali lecserélődést tapasztaltunk, ami teljesen apoláris oldalláncok esetén arra utalt, hogy az amid protonok nem árnyékoltak, ebből következően nincs jól meghatározott szerkezet. A **39** – **41** szekvenciákra azt találtuk, hogy a láncközi amid protonok hosszan megfigyelhetők (59. ábra). A teljes lecserélődés **39** esetén két hét alatt következett be, míg **40** láncnál ez idő múltán csak részleges cserét figyelhettünk meg. A **41** esetén a méréseket három hét múlva elvégezve is csak a lánc végén elhelyezkedő amid protonok (NH<sub>2</sub> és NH<sub>6</sub>) cserélődtek le. Ezek az adatok mindenképpen stabilis másodlagos szerkezetről árulkodtak, de a későbbi vizsgálataink fényében önasszociációra is utaltak.



**59. ábra.** A direkt amid proton lecserélődési adatok CD<sub>3</sub>OD-ban.

A legfontosabb különbség a H10 és H14 hélixek NMR spektroszkópiás viselkedésében az, hogy a H10 hélix C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>i</sub> - C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>i+2</sub> NOE kölcsönhatásokat kell adjon, de a H14 hélix C<sup>a</sup>H<sub>i</sub> -C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>i+3</sub> kontaktokat ad. A **39** vegyületre egy jól észlelhető intenzív keresztcsúcsot találtunk 2,85 ppm és 4,02 ppm között, amely a becsült távolságra < 2,5 Å értéket adott. A kisebb kémiai eltolódás könnyen hozzárendelhető a C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>2</sub> protonhoz, de a nagyobbik esetén a C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub> és C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>4</sub> átfedtek. A ciklusos oldallánc *trans*z-orientációja azonban C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>2</sub> és C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub> esetén nem tett lehetővé 3,5 Å-nél rövidebb távolságot, amit a <sup>3</sup>*J*(C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>2</sub>, C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub>) > 9,5 Hz értéke is alátámasztott. Továbbá a jól feloldott és összevetvethető C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>3</sub> - C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>3</sub> és C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>2</sub> - C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub> NOE-

k sokkal kisebb intenzitást mutattak (25%). Ezeket figyelembe véve a kérdéses keresztcsúcsot egyértelműen a C<sup>a</sup>H<sub>2</sub>-C<sup>β</sup>H<sub>4</sub> kölcsönhatáshoz rendeltük (60a. ábra). A C<sup>a</sup>H<sub>1</sub>-C<sup>β</sup>H<sub>3</sub> NOE kölcsönhatást nem találtuk meg, ami a hiányzó NH<sub>2</sub>-C<sup>a</sup>H<sub>1</sub> NOE-val együtt egy flexibilis N-terminális konformációra utalt. Ezzel együtt a C<sup>a</sup>H<sub>2</sub>-C<sup>β</sup>H<sub>4</sub> térközelség csak a CO<sub>4</sub>-NH<sub>3</sub> és a CO<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> H-kötések egyidejű kialakulásával volt fenntartható, ami már egy stabilis H10 hélix motívumot hozott létre a 2-4 aminosavegységek részvételével (60c ábra). A H10 hélix létrejötte valószínűleg azzal magyarázható, hogy ilyenkor kettő H-kötés jöhetett létre, míg ugyanennél a lánchossznál a H14 hélix csak egyet tett lehetővé. A Gellman csoport által tanulmányozott *transz*-ACHC tetramer az N-terminálison védett volt,<sup>189</sup> ezért ott összesen négy amid csoport állt rendelkezésre a H-kötésekhez, és az már elegendő volt ahhoz, hogy a H14 hélixnél is kialakulhasson legalább kettő H-kötés, így ott a H14 hélixet figyelték meg.



**60. ábra.** A **39** (a) és a **41** (b) láncokra megfigyelt távolható NOE kölcsöhatások. A **39** vegyületre kapott NMR szerkezet.

A **40** és **41** láncokra valamennyi C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>*i*</sub>-C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>*i*+ $\beta$ </sub> NOE kölcsönhatást megfigyeltük (60b. ábra). Ezek az adatok bizonyíttották a balmenetes (M) H14 hélix jelenlétét, ami összhangban volt az irodalmi adatokkal és azt jelezte, hogy a szabad N-terminális önmagában nem akadályozza a H14 hélix kiépülését még ezen a rövid lánchosszon sem.

Az **39** - **41** láncokra kapott ECD görbéket nagyon hasonlónak találtuk, de **39** kisebb normált intenzitást mutatott a negatív sávban **40** és **41**-hez képest. Ez az aszimmetria a nyújtottabb szerkezetre utalhatott.<sup>161</sup> A Cotton effektusok azonos előjele, az egyező helicitás irányt is mutatta mindhárom vegyületre nézve. A Cotton effektusok negatív sávja 217 nm-nél, a pozitív sáv pedig 197 nm-nél volt.

Végezetül a rendkívül lassú NH/ND csere felvetette a kérdést, hogy a hélixek metanolban önasszociációt mutathatnak-e. Ennek ellenőrzésése DOSY NMR méréseket végeztünk CD<sub>3</sub>OD-ban és a kapott aggregációs számok 5,91, 6,60 és 7,49 voltak rendre **39, 40** és **41**-re. Az amid protonok laterális védettsége és a fej-láb/fej-fej/láb-láb NOE kölcsönhatások hiánya

arra utalt, hogy az asszociációt az oldalláncok közötti szolvofób kölcsönhatások hajtották előre. Ez a hélix építőelemek egy magasabbrendű szervezettségét jelezte.

A fenti eredményekből arra következtethettünk, hogy még az ACHC oldalláncok merevségének ellenére is a  $\beta$ -peptid gerinc rendelkezik egy maradék flexibilitással és tetramer lánchossz esetén fel tudta venni a H10 hélix motívumot, ami pentamer felett H14 hélixbe ment át. Ez a megfigyelés alátámasztotta azt a feltételezést, hogy a H14 hélix kialakulása egy H10 intermedier motívummal nukleálódik. A vizsgálataink fényt derítettek arra is, hogy a hidrofób oldalláncok közötti kölcsönhatás még az ilyen rövid láncoknál is önasszociációhoz vezet, aminek a fő oka a rendezett egybefüggő felszín protikus oldószereket taszító hatása. Ezt a 4.4.2 fejezetben részletezem tovább.

# 4.3.2 Nagy átmérőjű H18 hélix létrehozása sztérikus-kontroll alatt lánchosszabbítással [11]

A 4.2.1 fejezetben elemeztem, hogy az oldalláncok sztérikus taszítása hogyan formálja át a hélix geometriáját. Ott az volt a megfigyelésünk, hogy a transz-ABHC monomerekből épített láncok hatékonyan destabilizálják a H14 hélixet és elősegítik a H12 hélix kialakulását. Bár mindkettő hélixben i – i+3 H-kötések jönnek létre, az oldalláncok relatív helyzete más. Az elméleti számítások azt jelezték előre, hogy ezek a rendszerek képesek lehetnek nagyobb átmérőjű hélixet is kialakítani, mert az i -i+3 helyzetű oldalláncok közötti ütközés elvileg úgy is elkerülhető, de ezt kísérletesen nem sikerült a homooligomereknél megfigyelni. Fontos megjegyezni, hogy az i – i+4 H-kötésekkel stabilizált foldamer hélixeket nem figyeltek meg az irodalomban. Ez mindenképpen érdekes, hiszen a természetes α-hélix szintén i – i+4 Hkötésekkel alakul ki. Ebben a munkában azt vizsgáltuk hogy a lánchosszabbítás segítségével el tudjuk-e érni, hogy a sztérikus taszítás miatt a hélixek nagyobb átmérővel stabilizálódjanak (H16 vagy H18). A láncok hosszabbítása azonban súlyos oldhatósági problémákhoz vezetett transz-ABHC homooligomerek esetén, ezért különböző mintázatokban hidrofil ß3-hSer aminosavegységeket építettünk a láncba (61. ábra). Kerültük a sóhidak létrehozására alkalmas ionizálható oldalláncok alkalmazását, hogy a sztérikus kölcsönhatásokra koncentrálhassunk. A homogén sztereokémiai elrendezés érdekében, az L-Ser-nel azonos térkémiájú β3-hSer-t (15,25,35,55)-ABHC építőelemekkel kombináltuk. Fontos tisztázandó kérdés volt, hogy mi a potenciális i - i+3 ABHC-ABHC kontaktok minimális aránya, ami még képes a H14 hélix kialakulását elterelni. Az ABHC egységeket úgy helyeztük el, hogy a heptamerek esetén a potenciális ABHC-ABHC kontaktok száma 1, 0 és 2 legyen (rendre a 42, 43 és 44 vegyületek). Az alábbi eredmények alapján aztán a 44 szekvenciának állítottuk elő az egy (45) illetve kettő (46) ABHC-vel meghosszabbított származékát. A kapcsolásokat Fmoc kémiával végeztük és az anyagokat HPLC-s tisztítás után LC-MS módszerrel jellemeztük és NMR spektroszkópiás elemzésnek vetettük alá. A jeldiszperzió elegendően jó volt ahhoz, hogy TOCSY és ROESY módszerek segítségével a teljes jelhozzárendelést elvégezzük a gerincre. A
méréseket 1 mM – 100  $\mu$ M tartományon végeztük DMSO- $d_6$  és CD<sub>3</sub>OH oldószerekben. Ezek az anyagok jellemzően nem oldódtak vízben.



**61. ábra.** A  $\beta^3$ -hSer és *transz*-ABHC monomerekből épített foldamerek és a CD<sub>3</sub>OH-ban megfigyelt távolható NOE kölcsönhatásaik.



**62. ábra.** A metanolban és 1 mM koncentrációban mért ECD görbék: **42** (fekete), **43** (zöld), **44** (szaggatott), **45** (kék) and **46** (piros)

Először az 1 mM-ban metanolban felvett ECD görbéket elemeztük részletesen (62. ábra). A **42** láncra egy minimumot 215 nm-nél és egy maximumot 195 nm-nél figyelhettünk meg, ez a negatív Cotton effektus egy balmenetes (M) H14 hélix jelenlétét jelezte. A **43**-ra kapott hasonló, de kékeltolódást mutató és alacsonyabb intenzitású görbe szintén a H14 hélixet támasztotta alá. Ettől jelentősen különbözött **44** görbéje, a pozitív Cotton effektus nagyhullámhosszú sávját 220 nm-nél, a negatív sávot 205 nm környékén találtuk. Ez a

korábbi rokon vegyületre kapott adatokkal összevetve egy jobbmenetes (P) H12 hélix jelenlétét támasztotta alá. Ezek az adatok azt jelezték, hogy a H12 hélix létrehozásához legalább kettő potenciális i – i+3 ABHC-ABHC ütközés beépítése szükséges. Ennek megfelelően a **45** és **46** szekvenciákat vizsgáltuk tovább és azt találtuk, hogy a Cotton effektus a lánchosszabításra újfent előjelet váltott. Ez arra utalt, a hogy helicitás megint irányt váltott, amit egy balmenetes H14 hélix kialakulásával magyarázhattunk volna, de ez valószínűtlen volt, mivel a beépített ABHC egységek megnövelték a potenciális oldallánc ütközések arányát. A legvalószínűbb magyarázat az volt, hogy az oktamer és nonamer szekvenciákra egy új balmenetes (M) hélix típust találtunk metanolban.

Az NMR mérések jelgazdag ROESY spektrumokat eredményeztek CD<sub>3</sub>OH-ban **42** és **43**ra. A H14 hélix karakterisztikus C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>i</sub> – NH<sub>i+3</sub> és C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>i</sub> – C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>i+3</sub> távolható NOE kölcsönhatásait azonosítottuk (61. ábra). Egyetlen C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>i</sub> – C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>i+2</sub> kölcsönhatást észleltünk **43** esetén, ami jelzi a lánc flexibilis viselkedését. Érdekes módon **42** és **43** DMSO-*d*<sub>6</sub>-ban kapott ROESY spektrumai jelszegények voltak, ami arra utalt, hogy a DMSO H-kötés romboló hatása ezeknél a kevésbé stabilis struktúráknál érvényesülhetett. A **42** esetén meglévő ABHC-ABHC taszítás magyarázza is ezt, de **43** láncnál más oldószer-specifikus okok játszhatnak közre. A **44** vegyület esetén mind a DMSO-*d*<sub>6</sub>-ban és a CD<sub>3</sub>OH-ban felvett ROESY spektrumok egyaránt számos C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>i</sub> – NH<sub>i+2</sub> és C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>i</sub> – C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>i+2</sub> NOE kölcsönhatást mutattak, továbbá DMSO-*d*<sub>6</sub>-ban Me<sub>i</sub> – NH<sub>i+3</sub> kontaktokat is megfigyeltünk. Ez elegendő adatot szolgáltatott a szerkezetfinomításhoz és eredményül egy kompakt jobbmenetes (P) H12 hélixet kaptunk. Ezt a NH-C<sup> $\beta$ </sup>H vicinális csatolások és a -5 ppb/K értéknél abszolút értékben kisebb amid proton kémiai eltolódás hőmérsékleti koefficiensek is alátámasztották.

A lánchosszabbítással kapott **45** és **46** esetén a NOE mintázatok oldószerfüggést mutattak. Amíg DMSO-*d*<sub>6</sub>-ban továbbra is a H12 hélixre jellemző C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>i</sub> – C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>i+2</sub> kölcsönhatásokat találtuk, CD<sub>3</sub>OH-ban jól megkülönböztethetően C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>i</sub> – C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>i+4</sub> távolható intramolekuláris NOE-k jelentek meg (61. ábra). A szerkezetfinomítás egy balmenetes (M) H18 hélixet eredményezett, ami jól magyarázta az NMR és az ECD adatokat is. Összhangban állt a NH – C<sup> $\beta$ </sup>H vicinális csatolásokkal és az abszolút értékben alacsony amid proton kémiai eltolódás hőmérsékleti koefficiensekkel is. A legjobb szerkezeteket B3LYP/6-311G\*\* elméleti szinten optimalizáltuk, a számítások megfelelően konvergáltak és a 18-tagú H-kötéses gyűrűk hálózata jól megfigyelhető volt. Ezek a kölcsönhatások az i – i+4 helyzetű aminosavegységek között jöttek létre. Ugyan a korábbi elméleti számítások alapján H16 hélixet vártunk, de a H18 hélixben sem lépett fel oldallánc taszítás egyrészt a konkrét oldallánc mintázat miatt, másrészt a H18 hélixben az oldalláncok nem pontosan egymás fölött helyezkednek el.

A NOE-k szempontjából fontos kivételt képeztek a **46** láncnál megfigyelt C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>1</sub> – C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>6</sub> és C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>3</sub> – C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>8</sub> kölcsönhatások. Továbbá átfedő jelként a C<sup> $\beta$ </sup>H<sub>2</sub> – C<sup> $\alpha$ </sup>H<sub>7</sub> kölcsönhatást is megtaláltuk. Ezeket a jeleket nem lehet egy önálló hélixszel megmagyarázni, a kérdéses

keresztcsúcsok egyidejű fellépésének egy fej-láb hélix asszociáció lehet az oka (63c és d ábrák).



**63. ábra.** A **45** (a) és **46** (b) vegyületekre NMR szerkezetfinomítással kapott H18 hélixek. A hélixhélix fej-láb asszociáció (c), amit intermolekuláris NOE kölcsönhatások (d, TOCSY: piros, ROESY: kék) alapján javasolunk **46** esetén.



64. ábra. Koncentráció-függő aggregációs számok: 44 (■), 45 (▲) és 46 (●).

Az összasszociáció kérdését **44-46** szekvenciákon tovább vizsgáltuk koncentráció-függő DOSY NMR, ECD és TEM segítségével. A metanolos DOSY mérések közvetlen bizonyítékot szolgáltattak az önszerveződésre (64. ábra). A **46** láncra az aggregációs számok meredeken konvergáltak a 9-hez és már 100 µM-nál platót értek el. A 100 µM-os mintán

felvett TEM képek 6 - 8 nm átmérőjű részecskéket mutattak összhangban a DOSY eredménnyel. A 44 és 45 szekvenciákra az aggregációs szám kisebb meredekséggel nőtt. Önasszociációt DMSO-*d*<sub>6</sub>-ban nem figyeltünk meg.



**65. ábra.** Koncentráció-függő ECD adatok metanolban: **44** (a), **45** (b) és **46** (c). A mellékábrák a 223 nm-nél mért intenzitásokat ábrázolják a koncentráció függvényében.

Az ECD görbék is koncentráció-függő viselkedést mutattak (65. ábra). Intenzitás változást ugyan megfigyeltünk 44 esetében, de a Cotton effektus pozitív előjele megmaradt. A 45 és 46 mintákat hígítva viszont azt tapasztaltuk, hogy az eredetileg hiányzó 220 nm környéki pozitív sáv hígításra megjelenik, így a Cotton effektus előjelet vált és 100 μM alatt egyértelműen felismerhetjük a H12 hélix ECD ujjlenyomatát, ha összehasonlítjuk a rövidebb lánchosszú 44 vegyületre kapott adatokkal. Fontos megjegyezni, hogy a hígításra az intenzitások nőttek, így nem a rendezetlen állapot felé mozdult el a rendszer, hanem egy másik rendezett állapotba.

Ezek az eredmények rávilágítanak arra, hogy a sztérikus oldallánc taszítással kikényszerített H12 hélixhez legalább kettő potenciális ABHC-ABHC ütközést kell a szekvenciákba tervezni heptamereknél. Az így kialakított hélixeket ABHC monomerekkel meghosszabbítva koncentráció- és oldószer-függő másodlagos szerkezeteket figyeltünk meg. DMSO-*d*<sub>6</sub>-ban továbbra is a H12 hélix maradt a domináns konformáció, de 100 μM

koncentráció fölött CD<sub>3</sub>OH-ban kialakult a H18 hélix. A koncentráció-függő DOSY és ECD mérések alátámasztják, hogy a konformációs átalakulás a hélixek közötti kölcsönhatásnak köszönhető. Továbbá NMR mérések igazolták, 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 Hkötésekkel stabilizált peptid foldamer hélixet, ami a közlés idején a legnagyobb átmérőjű ilyen típusú struktúra volt.

# 4.4 Foldamerek szupramolekuláris alkalmazása: nanostrukturált rendszerek

#### 4.4.1 Foldamer szálak fibrillumai [12, 5]

Az eddig bemutatott eredmények az önrendeződés másodlagos szerkezet szintjén történő szabályzására fókuszáltak. A magasabb rendű szerkezeti szintek feletti kontroll jelenleg még sokkal nagyobb kihívást jelent. A peptid foldamerek felfoghatók a szupramolekuláris kémiából már ismert tektonoknak, amelyek a megfelelő felszíni kémiai mintázattal ellátva önfelismerésre alkalmasak. Erre mutattam be példákat a 2.5.3 fejezetben. Ezek az önrendeződő harmadlagos/negyedleges szerkezetek később utat nyithatnak a komplex funkcióval rendelkező foldamer konstrukcióknak. Ebben a fejezetben arról számolok be, hogy a sztereokémiai mintázattal kikényszerített másodlagos szerkezet-változás hogyan alakítja át a foldamereink mint tektonok viselkedését, és miképpen változik a magasabb rendű szerkezet morfológiája a nanoméretek tartományában. Először a szálak önszerveződését mutatom be.





66. ábra. A vizsgált nanostruktúrákat alkotó foldamer tektononok.

A 4.1.1 és a 2.5.3 fejezetekben már előre vetítettem, hogy a szál szerkezetek a láncra merőlegesen álló peptidkötések és a potenciálisan hidrofób illeszkedést mutató oldalláncok miatt hajlamosabbak lehetnek az irányított önasszociációra és így kvázi végtelen redős szerkezetet hozhatnak létre. Ez a jelenség a rosszul feltekeredett fehérjék esetén nanodimenziókkal rendelkező fibrillumok képződésének formájában figyelhető meg.<sup>190</sup> Ezért

először az általunk elsőként kanyar motívum nélkül sztereokémiailag stabilizált Z6 szál (ld. 4.1.2 fejezet) önasszociációját vizsgáltuk és ehhez egy teljes isz-(1R,2S)-ACPC<sub>n</sub> sorozatot állítottunk elő pentamertől oktamer lánchosszig (66. ábra).



**67. ábra.** A metanolos oldatban 1 mM koncentrációban egy hétig inkubált minták TEM felvételei: **47** (a, mellékábrán hosszabb inkubációs idő mellett kapott hosszabb fibrillumok ); **5** (b, mellékábrán a vízben kapott adat); **48** (c); **5** (d, 1 nap inkubáció után).

A legfontosabb vizsgálati módszerünk ebben az esetben a transzmissziós elektron mikroszkópia volt uranil acetátos festési eljárással. A mintákat 1 mM koncentrációban egy héten át inkubáltuk szobahőn. A 4 vegyület nem mutatott semmilyen struktúrát; a TEM képek üresek voltak. A 47, 5 és 48 szálak viszont szalag alakú fibrillumokat alakítottak ki (67. ábra). A hosszúságuk a mikrométer tartományba esett, de a többi dimenzió konkrét geometriája erősen függött a lánchossztól. A szalagok szélessége 12-32, 30-50 és 100-400 nm volt rendre a 47, 5 és 48 láncokra. Vizes közegben szintén fel tudtuk ismerni a szalagokat, de azok sokkal szélesebbek voltak és kevésbé voltak szabályosak (67b mellékábra). Érdekes volt megfigyelni 47 és 5 esetén a helikális csavarodásokat a fibrillumokban. Ezek egy durva becslést tesznek lehetővé a fibrillumok vastagságára, ami 2-3 nm-re tehető. A fibrillumok képződése időfüggő folyamat, az 5-ből 1 nap után vett minta esetében jól láthatóak a rövidebb és részlegesen kiépült nanorészecskék.

dc\_335\_11



**68. ábra.** Az **5** vegyületből képződő fibrillumok molekuláris modellje. A HF/3-21G szinten számított antiparallel redő modell (a). A fibrillum modell "széles oldal" (b) és hosszanti tengely felőli (c) nézetei. Az ábrán a MD végén kapott alacsony energiájú modellt ábrázoltuk.

Kísérletet tettünk a fibrillumok finomszerkezetének modellezésére a következő megfigyelések és irodalmi adatok alapján. Sajnos a TEM felbontása nem tesz lehetővé pontos távolságmérést ebben a tartományban, de valószínűsíthető, hogy a fibrillum vastagsága megfelel egy Z6 szál hosszának az N- és C-terminálisok között (2-3 nm). A fibrillumok szélessége az oligomerek hosszával és az oldószer polaritásával nőtt, ami arra utal, hogy abban az irányban az oldalláncok hidrofób kölcsönhatásai adják a hajtóerőt az önrendeződéshez, ami így a redőzött rétegek szendvicsének képződéséhez vezet. A természetes fehérjéknél megfigyelt fibrillumoknál minden esetben kimutatták, hogy a fibrillumok hosszanti tengelyében a szálak között H-kötés alakul ki, így analógia alapján valószínű, hogy itt is ezek az erők hatnak. Ezekből az adatokből nem lehet meghatározni, hogy a szálak lefutása parallel vagy antiparallel. Annak érdekében, hogy a redőzött réteg egy építőeleméről képet kaphassunk, 5 heptamerekből parallel és antiparallel redő modellt építettünk és optimalizáltunk HF/3-21G elméleti szinten. Azt találtuk, hogy az így konstruált redőzött rétegek stabilisak lehetnek; a H-kötések jól illeszkedtek, és nem lépett fel sztérikus taszítás az oldalláncok között. Úgy láttuk azonban, hogy az antiparallel elrendezés jelentősen alacsonyabb konformációs energiához vezetett. Ezek alapján megalkottuk az 5-ből képződő

fibrillum molekuláris modelljét és 3 ns MD szimulációt hajtottunk végre explicit vízben periodikus határfeltételekkel. Ez a számítás azt mutatta, hogy nincs az így felépített modellben feszültség, a szerkezet kompakt maradt, és az energiaszint egy stacionárius szintre konvergált. A szimuláció végére a H-kötések tengelye mentén csavarodás jelentkezett, ami jó összhangot mutatott a kíséletesen talált fibrillum morfológiával. Hangsúlyozom, hogy a kísérletes adatok ugyan jól alátámasztják és segítik a foldamer fibrillumok felépülésének megértését, de a 68. ábrán feltüntett modell *in silico* kísérlet eredménye, és nem nagyfelbontású szerkezet-finomításból kaptuk.



69. ábra. A 9 szekvenciára kapott TEM eredmény vízben egy hetes inkubálás után.

A 4.1.3 fejezetben tárgyaltuk az alternáló sztereokémiai mintázattal tervezett H-[(1*R*,2*R*)-ACPC-(1*S*,2*S*)-ACPC]<sub>m</sub>-NH<sub>2</sub> szekvenciákat (**8** és **9**, 24. ábra) és az ECD alapján valószínűsítettük, hogy poláris szálat képeznek. A szálképző hajlamukat az elméleti számítások is alátámasztották (25. ábra). Itt a TEM vizsgálatok eredményeit mutatjuk be, megvizsgálandó a különböző szál szerkezet hatását a fibrillumok alakjára. A kérdéses vegyületek 4 mM-os oldatainak egy napos metanolban illetve vízben történő inkubációja után nem találtunk semmit a TEM látómezejében. Egy hetes szobahőmérsékletű állás után **9** vizes oldatában fibrillumokat láttunk, amelyeknek az átlagos szélessége 6 nm volt és a hosszúsága a  $\mu$ m-es nagyságrendbe esett (69. ábra) A fibrillumok egységesen helikális csavarodást mutattak 60 nm-es periódussal. Metanolban ugyan észleltünk aggregátumokat **9**-nél, de fibrilláris morfológiát nem találtunk. Az önasszociációt **8** tetramer esetén egyáltalán nem tudtuk megfigyelni. Figyelembe véve az irodalomban talált fibrillum-képző redős peptideket,<sup>190</sup> valamint a saját eredményeinket a nagy felbontással szerkezetileg hozzárendelt Z6-szál fibrillum képzéséről, arra a következtetésre jutottunk, hogy **9** is szál szerkezetet vesz fel. Itt eltekintünk a fibrillum szerkezetének további modellezésétől.

A fenti eredmények alapján kimondhattuk, hogy a foldamer szálak a  $\beta$ -redős, fibrillumképzésre hajlamos  $\alpha$ -peptidekkel analóg módon viselkednek, és ez is további alátámasztását adta a másodlagos szerkezetük geometriájának. A nanostrukturált fibrillumok lassan, lánchossz- és oldószer-függő módon alakultak ki. Ezt a jelenséget először mutattuk ki foldamerek körében, és ezzel módszert vezettünk be a peptid foldamereknél a szálképződési hajlam ellenőrzésére. Megfigyeléseink szerint a másodlagos szerkezet finomhangolása (nempoláris szál vs. poláris szál) jelentős hatással van a fibrillumképzési hajlamra és a morfológiára is.

#### 4.4.2 Foldamer hélixek vezikulái [12, 9]

A hidrofób oldalláncokkal ellátott hélixekkel való munkánk rávilágított arra, hogy ezek önasszociációja gyakran előforduló jelenség, ahogy ezt a 4.2 és 4.3 fejezetekben több helyen ki is kimutattuk DOSY NMR segítségével. Ez vetette fel a kérdést, hogy ezek a szabad (ionizálható) N-terminálissal és ciklusos hidrofób oldalláncokkal előállított kompakt másodlagos szerkezetek nem mutatnak-e önrendeződést a nanoméretek tartományában is. Továbbá érdekesnek tűnt megvizsgálni, hogy a hélixek önrendeződése milyen morfológiát követ. Először a homokirális *transz*-ACHC monomerekből felépített H14 hélixek (**39 - 41**, 57. ábra) oldatfázisú asszociációját figyeltük meg, így ezek TEM vizsgálatait mutatom be.

A **40** és **41** hélixek 1 mM-os mintáinak egynapos metanolban vagy vízben történő inkubációja után már szférikus részecskéket találtunk a TEM képeken (70. ábra). A gömbök átmérője kb. 180 nm volt **41** esetén. A **39** láncnál nem találtunk gömböket a TEM látómezőben, csak oligomer méretű aggregátumokat (70a. ábra). Gömbszerű részecskék csak 1 hét után jelentek meg. Az **39**-re jelentősen eltérő asszociációs hajlam jó összhangban állt a rövidebb lánchosszal és a jellegében különböző másodlagos szerkezettel (H10 hélix). A **41**-re kapott részecskék méretükben és formájukban az amfifil molekulákból létrejövő vezikulákra hasonlítottak (70c ábra). Azt a hipotézist követve, hogy a gömbök mono- vagy multilamellás vezikulumokként viselkednek, 15 perces ultrahangos kezelésnek (35 kHz, 34 W) vetettük őket alá, mert ez felfedheti a membránokból kialakuló finomszerkezet. A kezelés után felvett TEM képek egyértelműen szétesett vezikulákat mutattak, amelyek többrétegű membránokból épültek fel (70d. ábra). A membránok durva becsléssel meghatározott vastagsága 2 nm-volt. Fontos kiemelni, hogy a vezikulák az ultrahangos kezelés után egy nappal újra öszeálltak.

dc\_335\_11



**70. ábra.** A metanolos oldatban 1 mM koncentrációban egy napig inkubált minták TEM felvételei: **39** (a); **40** (b); **41** (c, mellékábrán az összetapadt részecskék); **41** (d, ultrahang hatására szétesett multilamelláris vezikulák).

A vezikulák jellemzően szívesen tapadtak össze. Ennek az a magyarázata, hogy a DLS-ben mért  $\zeta$ -potenciál 13 mV volt, ami igen alacsony mértékű felületi töltöttséget mutatott. Összehasonlításképpen a fibrillumok esetén 34 mV-ot mértünk. Ez azt jelezte, hogy a hélixek N-terminálisa részben a membrán belsejében deprotonált formában volt rejtve. A becsült membrán vastagságot és a felületi töltöttség értéket figyelembe véve arra gondoltunk, hogy a membrán vastagságát két hélix adja, amelyek tengely irányból kapcsolódtak össze. Ez többféleképpen valósulhatott meg, de mindenképp létrejöttek olyanok is, amelyek elrejtik a szabad N-terminálist. Ilyen modelleket építettünk és optimalizáltunk HF/3-21G szinten és ezekkel az építőelemekkel kettősréteget alakítottunk ki. Az egymás mellé rendeződő oldalláncok fogaskerékszerűen illeszkedtek egymásba. Ezt a fajta szoros illeszkedést a H14 hélix Röntgen szerkezeteiben is megfigyelték.<sup>189</sup> Az így felépített membrán kettősréteg modellel 3 ns explicit vizes dinamikát hajtottunk végre és a szerkezet stabilisnak mutatkozott. Megjegyzem, hogy az itt összeállított modell erősen közelítő jellegű, a helikális foldamerek asszociációjának egy lehetséges módját mutatja be.

dc\_335\_11



**71. ábra.** Az **41** vegyületből képződő vezikulák molekuláris modellje. A HF/3-21G szinten számított fej-fej (a) és fej-láb (b) hélix asszociáció. A membrán modell felszíni (c) és metszeti (d) nézetei. Az ábrán a MD végén kapott alacsony energiájú modellt ábrázoltuk.

Az oldatfázisú asszociációt megfigyeltük még az alternáló H10/12 hélixeknél is, ha ACHC oldallácokkal alakítottuk ki a szerkezetet **33** vegyület esetén (53. ábra). Ez jól összevethető a fenti eredményekkel, mert csak a sztereokémiai mintázat változik. A vizes oldatban kialakuló nano részecskéket TEM és DLS segítségével figyeltük meg. Metanolban ilyen jelenséget nem tapasztaltunk. A szűrés után felvett TEM képeken szintén vezikulákat figyeltünk meg a 100 nm-es mérettartományban, de alakjuk kevésbé volt szabályos mint **41** esetében (72a és b ábrák). Továbbá az oldallánc olyan kismértékű változtatása is, mint egy kettős kötés bevitele (**35**) megszüntette a vezikulum képzési hajlamot (72c és d ábrák). Ugyanilyen hatást mutatott (72e és f ábrák) a kompakt helikális szerkezet hiánya is (**37**).



**72. ábra.** A **33** (a és b), **35** (c és d) és **37** (e és f) vegyületek 4 mM vizes oldataira kapott TEM és DLS adatok.

Ezek az eremények igazolták azt, hogy a másodlagos szerkezet alaptípusa gyökeresen befolyásolta a nanoszintű rendeződés morfológiáját. Amíg a szálak a várt fibrillumokat alkották, a kompakt hidrofób felszínnel kiépített hélixek amfipatikus molekulákként viselkedtek és vezikulákat hoztak létre. Ezt a tulajdonságukat nyilvánvalóan a szabad N-terminálisnak is köszönhették, mert így alakulhatott ki a vertikálisan amfifil struktúra. Azt találtuk, hogy hélixek osztályán belül is, ha módosítottuk a hélix konkrét geometriáját, akkor a vezikulák alakja és kialakulási hajlama ezzel együtt erősen változott. Ilyen foldamer nanostruktúrák létezését elsőként figyeltük meg.

# 5 Összefoglalás

#### 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  $\varphi, \psi$  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 térkémia 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. Ebben az összefüggésben ezt egy szoftvernek foghatjuk fel, ami a peptidláncon mint hardveren "végrehajtódva" a másodlagos szerkezetet adja kimenetként. A szabályok prediktíveknek bizonyultak, segítségükkel több új másodlagos szerkezetet terveztünk és igazoltunk kísérletesen. Eddig az irodalomban 24  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -aminosavat tartalmazó foldamer periodikus másodlagos szerkezetet közöltek. Ebből 7 struktúrát (5 hélix- és 2 szál-típust) mi írtunk le először.

1.2 Felismertük, hogy cikloalifás oldalláncok esetén a helikális másodlagos szerkezet száltípusú konformációba kapcsolható, ha a homokirális *transz*-2-aminociklopentánkarbonsav egységeket *aisz*-2-aminociklopentánkarbonsav monomerekre cseréljük [4]. Nagyfelbontású NMR spektroszkópiás és más 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 hajtű-típusú stabilizáló elem nélkül, önmagában is stabilis volt. Ezzel az eredménnyel az elsők között mutattunk rá, hogy a  $\beta$ -peptid foldamerek körében a szerkezet sztereokémiai eszközökkel rendkívül hatékonyan szabályozható.

1.3 A sztereokémiai mintázat variálását kiterjesztettük dipeptid egységekre és *ab initio* kvantumkémiai modellezéssel alternáló kiralitású  $\beta$ -peptid oligomereket modelleztünk, majd a prediktált szerkezeteket kísérletesen ellenőriztük. NMR spektroszkópiás és egyéb kiegészítő

módszereket (IR, CD, VCD) alkalmazva megállapítottuk, hogy az alternáló *cisz*-2aminociklopentánkarbonsav szekvenciák (H-[(1*S*,2*R*)-ACPC-(1*R*,2*S*)-ACPC]<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>) igen stabilis H10/12 típusú alternáló hélixet alakítanak ki. Ez a szerkezet a hasonló irodalmi modellektől eltérően részben vízben is megtartotta szerkezetét [5].

1.4 Az alternáló enantiomerekkel kapcsolt *transz*-2-aminoaminociklopentánkarbonsav oligomerek (H-[(1*S*,2*S*)-ACPC-(1*R*,2*R*)-ACPC]<sub>m</sub>-NH<sub>2</sub>) 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  $\beta$ -peptid foldamerek valamennyi főbb másodlagos szerkezeti típusa kialakítható.

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. Ezek az eredmények rámutattak, hogy nem kell minden sztereocentrumot meghatároznunk ahhoz, hogy a másodlagos szerkezetet kiépíthessük.

1.6 A sztereokémiai programozás elvét alkalmazva olyan  $\beta$ -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 irányítottságú hélixeken, és példát ad a sztereokémiai kódolás hatékonyságára. Megmutattuk, hogy ezekben a szekvenciákban sem szükséges minden sztereocentrumot definiálni, így lehetővé vált, hogy minden harmadik aminosavegység proteinogén oldalláncot hordozzon.

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

1.8 Igazoltuk, hogy az α-aminosavak aránya tovább növelhető anélkül, hogy elveszítenénk a sztereokémiai mintázattal tervezett másodlagos szerkezetet. Új alternáló peptidirányítottságú αβ-peptideket terveztünk proteinogén 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  $\alpha$ -aminosavegységek a  $\beta$ -redőben ismert lokális konformációt vették fel, mégis a gerinc fő görbülete helikális maradt a sztereokémiai mintázatnak megfelelően.

1.9 A térkémiai 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 tudtunk végezni, ami jól jelzi a hélix típus inherens stabilitását. További előnye ennek a másodlagos szerkezetnek, hogy az  $\alpha$ -aminosavak elrendeződése diverz biomimetikus felszín létrehozását teszi lehetővé.

#### 2. Oldalláncok alakjának hatása a másodlagos szerkezetre.

2.1 Megállapítottuk, hogy a nagy térkitöltésű oldalláncok közötti hidrofób kölcsönhatások és a sztérikus taszítás a helikális szerkezet kialakulását erősen befolyásolhatják. 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 sztérikus 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 [8].

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 *cisz*-aminociklohex-3-én-karbonsav (*cisz*-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 inito* és molekuláris mechanikai számítások igazolták, hogy az áthidalt, nagytérkitöltésű és rigid ciklusos oldallácok a molekula makrociklusos konformációba történő önrendeződését segítik elő.

#### 3. Lánchossz-függő másodlagos szerkezetek.

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

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 hélixeket 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 µM koncentráció fölött CD<sub>3</sub>OH-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, 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 *cisz*-ACPC homooligomerek az önasszociáció során fibrilláris szerkezetet vesznek föl [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 nanostruktúrákat a  $\beta$ -peptid foldamerek körében először figyeltük meg és ez új utat nyithat az anyagtudományi alkalmazások irányába.

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

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 amfifil  $\beta$ peptid hélixek alkotják, amelyek hélixköteg motívumba rendeződnek. Ilyen foldamer nanostruktúrák létezését elsőként figyeltük meg.

4.4. A nanoméretű vezikulákat megfigyeltük az alternáló H10/12 hélixeknél is, ha ACHC oldallácokkal 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.

## 6 Gyakorlati hasznosítás lehetőségei és kitekintés

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 alkamazásait a 2.6 fejezetben 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.

Gyógyszerkutatási szempontból jelenleg az egyik legnagyobb kihívás a protein-protein és protein-szénhidrát kölcsöhatások 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.

## 7 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-2aminocyclopentanecarboxylic 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 cisbeta-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-lengthdependent 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-associationdriven transition of the beta-peptidic H12 helix to the H18 helix. Organic & Biomolecular Chemistry 2012, 10, 255-259.

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.

#### 8 Kapcsolódó közlemények

Az értekezés témájába közvetlenül nem tartozó, de a vizsgálat tárgyát vagy módszereit tekintve kapcsolódó közlemények: β-aminosavak, aminoalkoholok és származékaik szerkezetvizsgálata, fehérje-ligandum kölcsönhatások jellemzése, konformációs elemzésen alapuló 3+3D QSAR munkák.

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., (15)N and (13)C 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, A. T.; Bernath, G., The cis-trans isomerisation of homologous 2-hydroxycycloalkanecarboxylic 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 regioand diastereoselective syntheses of hydroxylated 2-aminocyclohexanecarboxylic acids. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 3214-3220.

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.

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-e] [1,3]oxazines. *Tetrahedron* **2003**, 59, 2877-2884.

21. Szakonyi, Z.; Balazs, A.; Martinek, T. A.; Fulop, F., Stereoselective synthesis of pinanebased 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.

## 9 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.

5. Haznagy-Radnai, E.; Rethy, B.; Czigle, 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.; Czigle, 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.; Szollsi, G.; Fogassy, G.; Bartok, M.; Olah, G. A., A new rigid cinchona modified (alpha-IQ) platinum catalyst for the enantio selective 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.

## 10 Irodalomjegyzék

(1) Lehn, J. M. Supramolecular chemistry : concepts and perspectives : a personal account built upon the George Fisher Baker lectures in chemistry at Cornell University [and] Lezioni Lincee, Accademia nazionale dei Lincei, Roma; VCH: Weinheim ; New York, 1995.

- (2) Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balaram, P. Chemical Reviews 2001, 101, 3131-3152.
- (3) Baltzer, L.; Nilsson, H.; Nilsson, J. Chemical Reviews 2001, 101, 3153-3163.
- (4) Gellman, S. H. Accounts of Chemical Research **1998**, *31*, 173-180.
- (5) Toth, G.; Ioja, E.; Tomboly, C.; Ballet, S.; Tourwe, D.; Peter, A.; Martinek, T.; Chung, N.
- N.; Schiller, P. W.; Benyhe, S.; Borsodi, A. Journal of Medicinal Chemistry 2007, 50, 328-333.
- (6) Seebach, D.; Ciceri, P. E.; Overhand, M.; Jaun, B.; Rigo, D.; Oberer, L.; Hommel, U.; Amstutz, R.; Widmer, H. *Helvetica Chimica Acta* **1996**, *79*, 2043-2066.
- (7) Seebach, D.; Gademann, K.; Schreiber, J. V.; Matthews, J. L.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. *Helvetica Chimica Acta* **1997**, *80*, 2033-2038.

(8) Hecht, S.; Huc, I. Foldamers : structure, properties, and applications; Wiley-VCH: Weinheim, 2007.

- (9) Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. Science 1991, 254, 1497-1500.
- (10) Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R. Y.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bartlett, P. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89*, 9367-9371.
- (11) Goodman, C. M.; Choi, S.; Shandler, S.; DeGrado, W. F. Nature Chemical Biology 2007, 3, 252-262.
- (12) Guichard, G.; Huc, I. Chemical Communications 2011, 47, 5933-5941.
- (13) Gyarmati, C. Z.; Palinko, I.; Bokros, A.; Martinek, A. T.; Bernath, G. *Chinese Journal of Chemistry* **2006**, *24*, 1792-1795.
- (14) Yang, D.; Liu, G. J.; Hao, Y.; Li, W.; Dong, Z. M.; Zhang, D. W.; Zhu, N. Y. *Chemistry-an Asian Journal* **2010**, *5*, 1356-1363.
- (15) Li, X.; Shen, B.; Yao, X. Q.; Yang, D. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 7264-7265.
- (16) Yang, D.; Zhang, D. W.; Hao, Y.; Wu, Y. D.; Luo, S. W.; Zhu, N. Y. Angewandte Chemie-International Edition 2004, 43, 6719-6722.
- (17) Zhang, Y. H.; Song, K. S.; Zhu, N. Y.; Yang, D. *Chemistry-a European Journal* **2010**, *16*, 577-587.
- (18) Chandrasekhar, S.; Rao, C. L.; Reddy, M. S.; Sharma, G. D.; Kiran, M. U.; Naresh, P.;
- Chaitanya, G. K.; Bhanuprakash, K.; Jagadeesh, B. Journal of Organic Chemistry 2008, 73, 9443-9446.
- (19) Chen, F.; Song, K. S.; Wu, Y. D.; Yang, D. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 743-755.
- (20) Tomasini, C.; Luppi, G.; Monari, M. Journal of the American Chemical Society 2006, 128, 2410-2420.
- (21) Angelici, G.; Luppi, G.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Hofmann, H. J.; Tomasini, C. *European Journal of Organic Chemistry* **2007**, 2713-2721.
- (22) Angelici, G.; Falini, G.; Hofmann, H. J.; Huster, D.; Monari, M.; Tomasini, C. *Chemistry-a European Journal* **2009**, *15*, 8037-8048.

(23) Angelici, G.; Falini, G.; Hofmann, H. J.; Huster, D.; Monari, M.; Tomasini, C. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 8075-8078.

(24) Delatouche, R.; Durini, M.; Civera, M.; Belvisi, L.; Piarulli, U. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 4278-4280.

(25) Benedetti, E.; Bavoso, A.; Diblasio, B.; Pavone, V.; Pedone, C.; Toniolo, C.; Bonora, G. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Physical Sciences* **1982**, *79*, 7951-7954.

(26) Smith, A. B.; Keenan, T. P.; Holcomb, R. C.; Sprengeler, P. A.; Guzman, M. C.; Wood, J.

L.; Carroll, P. J.; Hirschmann, R. Journal of the American Chemical Society 1992, 114, 10672-10674.

(27) Zhong, Z. Q.; Zhao, Y. Organic Letters 2007, 9, 2891-2894.

- (28) Zhao, Y.; Zhong, Z. Q. Journal of the American Chemical Society 2005, 127, 17894-17901.
- (29) Zhao, Y.; Zhong, Z. Q. Organic Letters 2006, 8, 4715-4717.
- (30) Zhao, Y.; Zhong, Z. Q. Journal of the American Chemical Society 2006, 128, 9988-9989.
- (31) Miller, S. L. Journal of the American Chemical Society 1955, 77, 2351-2361.
- (32) Ehrenfreund, P.; Glavin, D. P.; Botta, O.; Cooper, G.; Bada, J. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 2138-2141.

(33) Konishi, M.; Nishio, M.; Saitoh, K.; Miyaki, T.; Oki, T.; Kawaguchi, H. *Journal of Antibiotics* **1989**, *42*, 1749-1755.

- (34) Fulop, F.; Martinek, T. A.; Toth, G. K. Chemical Society Reviews 2006, 35, 323-334.
- (35) Banerjee, A.; Balaram, P. Current Science 1997, 73, 1067-1077.

(36) Seebach, D.; Overhand, M.; Kuhnle, F. N. M.; Martinoni, B.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. *Helvetica Chimica Acta* **1996**, *79*, 913-941.

- (37) Seebach, D.; Abele, S.; Gademann, K.; Guichard, G.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Matthews,
- J. L.; Schreiber, J. V. Helvetica Chimica Acta 1998, 81, 932-982.

(38) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Powell, D. R.; Huang, X. L.; Barchi, J. J.; Gellman, S. H. *Nature* **1997**, *387*, 381-384.

(39) Krauthauser, S.; Christianson, L. A.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 11719-11720.

(40) Mohle, K.; Gunther, R.; Thormann, M.; Sewald, N.; Hofmann, H. J. *Biopolymers* **1999**, *50*, 167-184.

- (41) Gunther, R.; Hofmann, H. J. Helvetica Chimica Acta 2002, 85, 2149-2168.
- (42) Wu, Y. D.; Wang, D. P. Journal of the American Chemical Society 1998, 120, 13485-13493.
- (43) Wu, Y. D.; Wang, D. P. Journal of the American Chemical Society 1999, 121, 9352-9362.
- (44) Beke, T.; Csizmadia, I. G.; Perczel, A. Journal of Computational Chemistry 2004, 25, 285-307.
- (45) Cheng, R. P.; DeGrado, W. F. Journal of the American Chemical Society 2001, 123, 5162-5163.

(46) Hetenyi, A.; Mandity, I. M.; Martinek, T. A.; Toth, G. K.; Fulop, F. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 547-553.

(47) Arvidsson, P. I.; Ryder, N. S.; Weiss, H. M.; Gross, G.; Kretz, O.; Woessner, R.; Seebach, D. *Chembiochem* **2003**, *4*, 1345-1347.

- (48) Sharma, G. V. M.; Rao, K. S.; Ravi, R.; Narsimulu, K.; Nagendar, P.; Chandramouli, C.; Kumar, S. K.; Kunwar, A. C. *Chemistry-an Asian Journal* **2009**, *4*, 181-193.
- (49) Martinek, T. A.; Mandity, I. M.; Fulop, L.; Toth, G. K.; Vass, E.; Hollosi, M.; Forro, E.; Fulop, F. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 13539-13544.
- (50) Mandity, I. M.; Fulop, L.; Vass, E.; Toth, G. K.; Martinek, T. A.; Fulop, F. Organic Letters **2010**, *12*, 5584-5587.
- (51) Townsley, L. E.; Tucker, W. A.; Sham, S.; Hinton, J. F. Biochemistry 2001, 40, 11676-11686.

- (52) Fernandes, C.; Faure, S.; Pereira, E.; Thery, V.; Declerck, V.; Guillot, R.; Aitken, D. J. Organic Letters **2010**, *12*, 3606-3609.
- (53) Threlfall, R.; Davies, A.; Howarth, N. M.; Fisher, J.; Cosstick, R. *Chemical Communications* **2008**, 585-587.
- (54) Chandrasekhar, S.; Reddy, G. P. K.; Kiran, M. U.; Nagesh, C.; Jagadeesh, B. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 2969-2973.
- (55) Seebach, D.; Abele, S.; Gademann, K.; Jaun, B. *Angewandte Chemie-International Edition* **1999**, *38*, 1595-1597.
- (56) Daura, X.; Gademann, K.; Schafer, H.; Jaun, B.; Seebach, D.; van Gunsteren, W. F. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 2393-2404.
- (57) Torres, E.; Puigmarti-Luis, J.; del Pino, A. P.; Ortuno, R. M.; Amabilino, D. B. Organic & Biomolecular Chemistry **2010**, *8*, 1661-1665.
- (58) Rua, F.; Boussert, S.; Parella, T.; Diez-Perez, I.; Branchadell, V.; Giralt, E.; Ortuno, R. M. *Organic Letters* **2007**, *9*, 3643-3645.
- (59) Torres, E.; Gorrea, E.; Burusco, K. K.; Da Silva, E.; Nolis, P.; Rua, F.; Boussert, S.; Diez-Perez, I.; Dannenberg, S.; Izquierdo, S.; Giralt, E.; Jaime, C.; Branchadell, V.; Ortuno, R. M. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 564-575.
- (60) Seebach, D.; Beck, A. K.; Bierbaum, D. J. Chemistry & Biodiversity 2004, 1, 1111-1239.
- (61) Hanessian, S.; Luo, X. H.; Schaum, R.; Michnick, S. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 8569-8570.
- (62) Sharma, G. V. M.; Jayaprakash, P.; Narsimulu, K.; Sankar, A. R.; Reddy, K. R.; Krishna, P. R.; Kunwar, A. C. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 2944-2947.
- (63) Farrera-Sinfreu, J.; Zaccaro, L.; Vidal, D.; Salvatella, X.; Giralt, E.; Pons, M.; Albericio, F.;
- Royo, M. Journal of the American Chemical Society 2004, 126, 6048-6057.
- (64) Baldauf, C.; Gunther, R.; Hofmann, H. J. Helvetica Chimica Acta 2003, 86, 2573-2588.
- (65) Vasudev, P. G.; Shamala, N.; Ananda, K.; Balaram, P. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, 4972-4975.
- (66) Khurram, M.; Qureshi, N.; Smith, M. D. Chemical Communications 2006, 5006-5008.
- (67) Jones, C. R.; Qureshi, M. K. N.; Truscott, F. R.; Hsu, S. T. D.; Morrison, A. J.; Smith, M. D. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 7099-7102.
- (68) Le Grel, P.; Salaun, A.; Potel, M.; Le Grel, B.; Lassagne, F. *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 5638-5645.
- (69) Simo, C.; Salaun, A.; Arnarez, C.; Delemotte, L.; Haegy, A.; Kachmar, A.; Laurent, A. D.; Thomas, J.; Jamart-Gregoire, B.; Le Grel, P.; Hocquet, A. *Journal of Molecular Structure-Theochem* **2008**, *869*, 41-46.
- (70) Le Grel, P.; Salaun, A.; Mocquet, C.; Perochon, R.; Lecorgne, A.; Le Grel, B.; Potel, M. *Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 8579-8582.
- (71) Violette, A.; Averlant-Petit, M. C.; Semetey, V.; Hemmerlin, C.; Casimir, R.; Graff, R.; Marraud, M.; Briand, J. P.; Rognan, D.; Guichard, G. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 2156-2164.
- (72) Violette, A.; Lancelot, N.; Poschalko, A.; Piotto, M.; Briand, J. P.; Raya, J.; Elbayed, K.; Bianco, A.; Guichard, G. *Chemistry-a European Journal* **2008**, *14*, 3874-3882.
- (73) Fischer, L.; Didierjean, C.; Jolibois, F.; Semetey, V.; Lozano, J. M.; Briand, J. P.; Marraud, M.; Poteau, R.; Guichard, G. Organic & Biomolecular Chemistry **2008**, *6*, 2596-2610.
- (74) Fischer, L.; Claudon, P.; Pendem, N.; Miclet, E.; Didierjean, C.; Ennifar, E.; Guichard, G. *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, *49*, 1067-1070.

(75) Claudon, P.; Violette, A.; Lamour, K.; Decossas, M.; Fournel, S.; Heurtault, B.; Godet, J.; Mely, Y.; Jamart-Gregoire, B.; Averlant-Petit, M. C.; Briand, J. P.; Duportail, G.; Monteil, H.; Guichard, G. *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, *49*, 333-336.

(76) Prabhakaran, P.; Kale, S. S.; Puranik, V. G.; Rajamohanan, P. R.; Chetina, O.; Howard, J. A. K.; Hofmann, H. J.; Sanjayan, G. J. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 17743-17754.

(77) Yang, D.; Qu, J.; Li, W.; Wang, D. P.; Ren, Y.; Wu, Y. D. Journal of the American Chemical Society **2003**, *125*, 14452-14457.

(78) Yang, D.; Li, W.; Qu, J.; Luo, S. W.; Wu, Y. D. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 13018-13019.

(79) Sharma, G. V. M.; Chandramouli, N.; Basha, S. J.; Nagendar, P.; Ramakrishna, K. V. S.; Sarma, A. V. S. *Chemistry-an Asian Journal* **2011**, *6*, 84-97.

(80) De Pol, S.; Zorn, C.; Klein, C. D.; Zerbe, O.; Reiser, O. Angewandte Chemie-International Edition **2004**, *43*, 511-514.

(81) Hayen, A.; Schmitt, M. A.; Ngassa, F. N.; Thomasson, K. A.; Gellman, S. H. *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43*, 505-510.

(82) Schmitt, M. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 6848-6849.

(83) Choi, S. H.; Guzei, I. A.; Spencer, L. C.; Gellman, S. H. Journal of the American Chemical Society **2008**, 130, 6544-6550.

(84) Baldauf, C.; Gunther, R.; Hofmann, H. J. Biopolymers 2006, 84, 408-413.

(85) Zhu, X. A.; Koenig, P.; Hoffmann, M.; Yethiraj, A.; Cui, Q. A. *Journal of Computational Chemistry* **2010**, *31*, 2063-2077.

(86) Zhu, X.; Koenig, P.; Gellman, S. H.; Yethiraj, A.; Cui, Q. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 5439-5448.

(87) Zhu, X.; Yethiraj, A.; Cui, Q. Journal of Chemical Theory and Computation 2007, 3, 1538-1549.

(88) Schmitt, M. A.; Choi, S. H.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. Journal of the American Chemical Society 2005, 127, 13130-13131.

(89) Seebach, D.; Jaun, B.; Sebesta, R.; Mathad, R. I.; Flogel, O.; Limbach, M.; Sellner, H.; Cottens, S. *Helvetica Chimica Acta* **2006**, *89*, 1801-1825.

(90) Jagadeesh, B.; Prabhakar, A.; Sarma, G. D.; Chandrasekhar, S.; Chandrashekar, G.; Reddy, M. S.; Jagannadh, B. *Chemical Communications* **2007**, 371-373.

(91) Segman, S.; Lee, M. R.; Vaiser, V.; Gellman, S. H.; Rapaport, H. Angewandte Chemie-International Edition 2010, 49, 716-719.

(92) Roy, R. S.; Karle, I. L.; Raghothama, S.; Balaram, P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 16478-16482.

(93) Roy, R. S.; Gopi, H. N.; Raghothama, S.; Karle, I. L.; Balaram, P. *Chemistry-a European Journal* **2006**, *12*, 3295-3302.

(94) Wang, D. Q.; Jaun, B.; van Gunsteren, W. F. Chembiochem 2009, 10, 2032-2041.

(95) Gardiner, J.; Mathad, R. I.; Jaun, B.; Schreiber, J. V.; Flogel, O.; Seebach, D. *Helvetica Chimica Acta* **2009**, *92*, 2698-2721.

(96) Choi, S. H.; Guzei, I. A.; Spencer, L. C.; Gellman, S. H. Journal of the American Chemical Society 2009, 131, 2917-2924.

(97) Schmitt, M. A.; Choi, S. H.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. Journal of the American Chemical Society 2006, 128, 4538-4539.

(98) Baldauf, C.; Gunther, R.; Hofmann, H. J. Journal of Organic Chemistry 2006, 71, 1200-1208.

(99) Vasudev, P. G.; Ananda, K.; Chatterjee, S.; Aravinda, S.; Shamala, N.; Balaram, P. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 4039-4048.

(100) Vasudev, P. G.; Chatterjee, S.; Ananda, K.; Shamala, N.; Balaram, P. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 6430-6432.

(101) Chatterjee, S.; Vasudev, P. G.; Ananda, K.; Raghothama, S.; Shamala, N.; Balaram, P. *Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 6595-6606.

(102) Guo, L.; Chi, Y. G.; Almeida, A. M.; Guzei, I. A.; Parker, B. K.; Gellman, S. H. Journal of the American Chemical Society 2009, 131, 16018-16019.

(103) Sharma, G. V. M.; Jadhav, V. B.; Ramakrishna, K. V. S.; Jayaprakash, P.; Narsimulu, K.; Subash, V.; Kunwar, A. C. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 14657-14668.

(104) Guo, L.; Almeida, A. M.; Zhang, W.; Reidenbach, A. G.; Choi, S. H.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 7868-7869.

(105) Pályi, G.; Zucchi, C.; Caglioti, L.; 1st ed.; Elsevier: Amsterdam ; Boston, 2004, p 1 online resource (xiii, 429 p.

(106) Meierhenrich, U. *Amino acids and the asymmetry of life : caught in the act of formation*; 1st ed.; Springer: New York, 2008.

(107) Carroll, J. D. Chirality 2009, 21, 354-358.

(108) Mahalakshmi, R.; Balaram, P. The use of D-amino acids in peptide design; 1 ed.; Nova Science Publishers, 2006.

(109) Rana, S.; Kundu, B.; Durani, S. Chemical Communications 2005, 207-209.

(110) Rana, S.; Kundu, B.; Durani, S. Chemical Communications 2004, 2462-2463.

(111) Rana, S.; Kundu, B.; Durani, S. Biopolymers 2005, 80, 531-531.

(112) Rana, S.; Kundu, B.; Durani, S. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2007, 15, 3874-3882.

(113) Raguse, T. L.; Lai, J. R.; LePlae, P. R.; Gellman, S. H. Organic Letters 2001, 3, 3963-3966.

(114) Cheng, R. P.; DeGrado, W. F. Journal of the American Chemical Society **2002**, 124, 11564-11565.

(115) Bruckner, A. M.; Chakraborty, P.; Gellman, S. H.; Diederichsen, U. Angewandte Chemie-International Edition 2003, 42, 4395-4399.

(116) Kwon, S.; Jeon, A.; Yoo, S. H.; Chung, I. S.; Lee, H. S. Angewandte Chemie-International Edition **2010**, *49*, 8232-8236.

(117) Daniels, D. S.; Petersson, E. J.; Qiu, J. X.; Schepartz, A. Journal of the American Chemical Society 2007, 129, 1532-1533.

(118) Qiu, J. X.; Petersson, E. J.; Matthews, E. E.; Schepartz, A. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 11338-11339.

(119) Goodman, J. L.; Petersson, E. J.; Daniels, D. S.; Qiu, J. X.; Schepartz, A. Journal of the American Chemical Society 2007, 129, 14746-14751.

(120) Molski, M. A.; Goodman, J. L.; Craig, C. J.; Meng, H.; Kumar, K.; Schepartz, A. Journal of the American Chemical Society 2010, 132, 3658-3659.

(121) Petersson, E. J.; Craig, C. J.; Daniels, D. S.; Qiu, J. X.; Schepartz, A. Journal of the American Chemical Society 2007, 129, 5344-5346.

(122) Giuliano, M. W.; Horne, W. S.; Gellman, S. H. Journal of the American Chemical Society 2009, 131, 9860-9861.

(123) Oshea, E. K.; Klemm, J. D.; Kim, P. S.; Alber, T. Science 1991, 254, 539-544.

(124) Horne, W. S.; Price, J. L.; Keck, J. L.; Gellman, S. H. Journal of the American Chemical Society 2007, 129, 4178-4179.

(125) Harbury, P. B.; Zhang, T.; Kim, P. S.; Alber, T. Science 1993, 262, 1401-1407.

(126) Lumb, K. J.; Kim, P. S. Biochemistry 1995, 34, 8642-8648.

(127) Price, J. L.; Horne, W. S.; Gellman, S. H. Journal of the American Chemical Society 2007, 129, 6376-6378.

(128) Price, J. L.; Hadley, E. B.; Steinkruger, J. D.; Gellman, S. H. Angewandte Chemie-International Edition 2010, 49, 368-371.

(129) Beke, T.; Somlai, C.; Magyarfalvi, G.; Perczel, A.; Tarczay, G. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 7918-7926.

(130) Beke, T.; Czajlik, A.; Balint, B.; Perczel, A. Acs Nano 2008, 2, 545-553.

(131) Beke, T.; Csizmadia, I. G.; Perczel, A. Journal of the American Chemical Society 2006, 128, 5158-5167.

(132) Clark, T. D.; Buehler, L. K.; Ghadiri, M. R. Journal of the American Chemical Society 1998, 120, 651-656.

(133) Stoeckli, M.; Staab, D.; Schweitzer, A.; Gardiner, J.; Seebach, D. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 2007, 18, 1921-1924.

(134) Ross, N. T.; Katt, W. P.; Hamilton, A. D. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* **2010**, *368*, 989-1008.

(135) Martinek, T. A.; Fulop, F. European Journal of Biochemistry 2003, 270, 3657-3666.

(136) Shandler, S. J.; Korendovych, I. V.; Moore, D. T.; Smith-Dupont, K. B.; Streu, C. N.;

Litvinov, R. I.; Billings, P. C.; Gai, F.; Bennett, J. S.; DeGrado, W. F. Journal of the American Chemical Society 2011, 133, 12378-12381.

(137) Gademann, K.; Ernst, M.; Hoyer, D.; Seebach, D. Angewandte Chemie-International Edition **1999**, *38*, 1223-1226.

(138) Kritzer, J. A.; Hodsdon, M. E.; Schepartz, A. Journal of the American Chemical Society 2005, 127, 4118-4119.

(139) Kritzer, J. A.; Lear, J. D.; Hodsdon, M. E.; Schepartz, A. Journal of the American Chemical Society 2004, 126, 9468-9469.

(140) Kritzer, J. A.; Luedtke, N. W.; Harker, E. A.; Schepartz, A. Journal of the American Chemical Society 2005, 127, 14584-14585.

(141) Michel, J.; Harker, E. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L.; Schepartz, A. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 6356-6357.

(142) Bautista, A. D.; Appelbaum, J. S.; Craig, C. J.; Michel, J.; Schepartz, A. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 2904-2905.

(143) Campbell, F.; Plante, J. P.; Edwards, T. A.; Warriner, S. L.; Wilson, A. J. Organic & Biomolecular Chemistry **2010**, *8*, 2344-2351.

(144) Plante, J. P.; Burnley, T.; Malkova, B.; Webb, M. E.; Warriner, S. L.; Edwards, T. A.; Wilson, A. J. *Chemical Communications* **2009**, 5091-5093.

(145) Lee, E. F.; Sadowsky, J. D.; Smith, B. J.; Czabotar, P. E.; Peterson-Kaufman, K. J.; Colman,

P. M.; Gellman, S. H.; Fairlie, W. D. Angewandte Chemie-International Edition 2009, 48, 4318-4322.

(146) Sadowsky, J. D.; Fairlie, W. D.; Hadley, E. B.; Lee, H. S.; Umezawa, N.; Nikolovska-

Coleska, Z.; Wang, S. M.; Huang, D. C. S.; Tomita, Y.; Gellman, S. H. Journal of the American Chemical Society 2007, 129, 139-154.

(147) Sadowsky, J. D.; Schmitt, M. A.; Lee, H. S.; Umezawa, N.; Wang, S. M.; Tomita, Y.; Gellman, S. H. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 11966-11968.

(148) Horne, W. S.; Boersma, M. D.; Windsor, M. A.; Gellman, S. H. Angewandte Chemie-International Edition 2008, 47, 2853-2856.

(149) Bautista, A. D.; Stephens, O. M.; Wang, L. G.; Domaoal, R. A.; Anderson, K. S.; Schepartz, A. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2009, 19, 3736-3738.

(150) Stephens, O. M.; Kim, S.; Welch, B. D.; Hodsdon, M. E.; Kay, M. S.; Schepartz, A. Journal of the American Chemical Society 2005, 127, 13126-13127.

- (151) Horne, W. S.; Johnson, L. M.; Ketas, T. J.; Klasse, P. J.; Lu, M.; Moore, J. P.; Gellman, S. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, *106*, 14751-14756.
  (152) Johnson, L. M.; Horne, W. S.; Gellman, S. H. *Journal of the American Chemical Society* 2011, *133*, 10038-10041.
- (153) Kaszowska, M.; Norgren, A. S.; Arvidson, P. I.; Sandstrom, C. *Carbohydrate Research* 2009, 344, 2577-2580.
- (154) Gelman, M. A.; Richter, S.; Cao, H.; Umezawa, N.; Gellman, S. H.; Rana, T. M. Organic Letters 2003, *5*, 3563-3565.
- (155) Imamura, Y.; Watanabe, N.; Umezawa, N.; Iwatsubo, T.; Kato, N.; Tomita, T.; Higuchi, T. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 7353-7359.
- (156) Epand, R. F.; Raguse, T. L.; Gellman, S. H.; Epand, R. M. Biochemistry 2004, 43, 9527-9535.
- (157) Epand, R. F.; Mowery, B. P.; Lee, S. E.; Stahl, S. S.; Lehrer, R. I.; Gellman, S. H.; Epand, R. M. *Journal of Molecular Biology* **2008**, *379*, 38-50.
- (158) Liu, D. H.; DeGrado, W. F. Journal of the American Chemical Society 2001, 123, 7553-7559.
- (159) Chene, P. Nature Reviews Cancer 2003, 3, 102-109.
- (160) Harker, E. A.; Daniels, D. S.; Guarracino, D. A.; Schepartz, A. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2009, 17, 2038-2046.

(161) Daura, X.; Bakowies, D.; Seebach, D.; Fleischhauer, J.; van Gunsteren, W. F.; Kruger, P. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **2003**, *32*, 661-670.

(162) Glattli, A.; Daura, X.; Seebach, D.; van Gunsteren, W. F. Journal of the American Chemical Society 2002, 124, 12972-12978.

(163) Pomerantz, W. C.; Grygiel, T. L. R.; Lai, J. R.; Gellman, S. H. Organic Letters 2008, 10, 1799-1802.

- (164) Halgren, T. A. Journal of Computational Chemistry 1996, 17, 490-519.
- (165) Halgren, T. A. Journal of Computational Chemistry 1999, 20, 730-748.
- (166) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Chemical Reviews 2005, 105, 2999-3093.
- (167) Topol, I. A.; Burt, S. K.; Deretey, E.; Tang, T. H.; Perczel, A.; Rashin, A.; Csizmadia, I. G. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 6054-6060.
- (168) Arvidsson, P. I.; Rueping, M.; Seebach, D. Chemical Communications 2001, 649-650.
- (169) Kritzer, J. A.; Tirado-Rives, J.; Hart, S. A.; Lear, J. D.; Jorgensen, W. L.; Schepartz, A.
- Journal of the American Chemical Society **2005**, 127, 167-178.

(170) Hetenyi, A.; Szakonyi, Z.; Mandity, I. M.; Szolnoki, E.; Toth, G. K.; Martinek, T. A.; Fulop, F. *Chemical Communications* **2009**, 177-179.

- (171) Mandity, I. M.; Weber, E.; Martinek, T. A.; Olajos, G.; Toth, G. K.; Vass, E.; Fulop, F. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 2171-2175.
- (172) Ananda, K.; Vasudev, P. G.; Sengupta, A.; Raja, K. M. P.; Shamala, N.; Balaram, P. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 16668-16674.
- (173) Sharma, G. V. M.; Nagendar, P.; Jayaprakash, P.; Krishna, P. R.; Ramakrishna, K. V. S.; Kunwar, A. C. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, 5878-5882.
- (174) Srinivasulu, G.; Kumar, S. K.; Sharma, G. V. M.; Kunwar, A. C. Journal of Organic Chemistry 2006, 71, 8395-8400.
- (175) Diblasio, B.; Saviano, M.; Fattorusso, R.; Lombardi, A.; Pedone, C.; Valle, V.; Lorenzi, G. P. *Biopolymers* **1994**, *34*, 1463-1468.
- (176) Daggett, V. Accounts of Chemical Research 2006, 39, 594-602.
- (177) Martinek, T. A.; Toth, G. K.; Vass, E.; Hollosi, M.; Fulop, F. Angewandte Chemie-International Edition 2002, 41, 1718-1721.

- (178) Chandrasekhar, S.; Babu, B. N.; Prabhakar, A.; Sudhakar, A.; Reddy, M. S.; Kiran, M. U.; Jagadeesh, B. *Chemical Communications* **2006**, 1548-1550.
- (179) Kothari, A.; Qureshi, M. K. N.; Beck, E. M.; Smith, M. D. *Chemical Communications* **2007**, 2814-2816.
- (180) Rueping, M.; Mahajan, Y. R.; Jaun, B.; Seebach, D. Chemistry-a European Journal 2004, 10, 1607-1615.
- (181) Abraham, M. H.; Abraham, R. J.; Byrne, J.; Griffiths, L. *Journal of Organic Chemistry* 2006, 71, 3389-3394.
- (182) Szakonyi, Z.; Martinek, T. A.; Sillanpaa, R.; Fulop, F. *Tetrahedron-Asymmetry* **2008**, *19*, 2296-2303.
- (183) Chandrasekhar, S.; Sudhakar, A.; Kiran, M. U.; Babu, B. N.; Jagadeesh, B. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 7368-7371.
- (184) Wieprecht, T.; Apostolov, O.; Beyermann, M.; Seelig, J. *Journal of Molecular Biology* 1999, *294*, 785-794.
- (185) Wieprecht, T.; Beyermann, M.; Seelig, J. Biophysical Chemistry 2002, 96, 191-201.
- (186) Sakajiri, K.; Satoh, K.; Kawauchi, S.; Watanabe, J. Journal of Molecular Structure 1999, 476, 1-8.
- (187) Otoda, K.; Kitagawa, Y.; Kimura, S.; Imanishi, Y. Biopolymers 1993, 33, 1337-1345.
- (188) Vieira-Pires, R. S.; Morais-Cabral, J. H. Journal of General Physiology 2010, 136, 585-592.
- (189) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. Journal of the American Chemical Society **1999**, *121*, 6206-6212.
- (190) Fandrich, M. Cellular and Molecular Life Sciences 2007, 64, 2066-2078.

## 11 Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Fülöp Ferenc professzor úrnak, hogy befogadott a csoportjába és aztán később is vele dolgozhattam. Nem hagyott elkallódni annak ellenére sem, hogy az elején bizonyos dolgok keresztülhúzták számításainkat. A foldamerekkel az ő inspirációjára kezdtem foglalkozni.

Hálás vagyok Frank G. Riddellnek, aki a St. Andews-i Egyetemen megmutatta, hogy memcsak a lombik mellett lehet valaki jó vegyész.

Ezeket az eredményeket nem érhettük volna el, ha nincs mögöttünk az Intézet munkatársainak munkája, amivel a különleges aminosavakat biztosították számunkra. Köszönet illeti Szakonyi Zsoltot, Forró Enikőt és Árva Juditot. Ezen túl is köszönöm az Intézet minden jelenlegi és volt munkatársának, hogy ebben a kreatív és jókedvű közegben dolgozhattam.

Nem voltam egyedül. Hálás vagyok Hetényi Anasztáziának, Mándity Istvánnak, Wéber Editnek és Szolnoki Évának, hogy PhD hallgatóként szívvel lélekkel dolgoztak. Sok munkájuk van ezekben az eredményekben. Köszönöm Hegedűs Zsófiának, Olajos Gábornak és Németh Lukácsnak, akikkel eddig diákkörösként dolgoztunk együtt, hogy már új vizeken vitorláznak velem. Külön köszönöm Simon Istvánnak, hogy rá mindig lehet számítani.

Köszönöm a kooperáló partnereknek, hogy mindig készek voltak az együttműködésre. Prof. Tóth Gábor megtanított minket a peptidszintézisre, Prof. Hollósi Miklós és Vass Elemér vezetett be minket a kiroptikába. Fülöp Lívia az elektronmikroszkópiában volt óriási segítségünkre. Köszönet illeti Prof. Dombi Györgyöt, mert nélküle nem lenne az SZTE-n ilyen NMR laboratórium.

Hálás vagyok szüleimnek, azt hiszem, sikerült nekik. Ezt a dolgozatot néhai édesanyámnak ajánlom. A bátyámnak is köszönöm, nagyon sokszor bátorított.

Végül pont ennek a dolgozatnak lehetek hálás, mert az otthoni írás lehetővé tette, hogy sokat legyünk együtt a családommal. Julcsi és Zsazsi vidámsága többször átsegített a holtponton. Andrissal sok jó zenét hallgattunk együtt írás közben, bár erre még ő aligha fog emlékezni. Feleségemnek, Joó Gabriellának köszönök mindent. Különösen hálás vagyok a gyümölcssalátákért és az alapos korrektúrázásért.