

beke.somfai.tamas\_351\_25

# Peptidrendszerek funkcionális szerveződése

Beke-Somfai Tamás

MTA doktori értekezés

Tézisfüzet

**HUN-REN**  
Magyar Kutatási Hálózat

HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont, Budapest, 2025

## Tartalomjegyzék

---

Bevezetés .....	7
Irodalmi áttekintés .....	8
Természetes peptidek.....	8
Építőelemek, konformációs variabilitás.....	8
Peptidek és fehérjék, a két csoport közötti különbség .....	8
Antimikrobiális peptidek.....	10
Membránaktív peptidek térszerkezetváltozása .....	12
Peptidek szerveződése, oligomerizáció, asszociáció .....	13
Nem természetes peptidek.....	15
$\beta$ -peptidek.....	15
$\beta$ -peptidek elsődleges szerkezeti tulajdonságai .....	16
Másodlagos szerkezet, magasabb rendű szerkezetek, környezetfüggő konformációs polimorfizmus és kapcsolt bioaktivitás .....	17
Triazol foldamerek .....	19
Triazolok, mint aminosav építőelemek peptidekben .....	20
Módszerek.....	23
Peptidek szintézise.....	23
Szerkezetvizsgálat .....	23
Elektronikus cirkuláris dikroizmus (CD).....	23
Fluoreszcens spektroszkópia.....	24
Folyadékfázisú lineáris dikroizmus (LD) .....	24
NMR spektroszkópia .....	25
Infravörös spektroszkópia (ATR FTIR) .....	25
Morfológia és részecskeméret.....	26
Transzmissziós elektron mikroszkópia (TEM), fagyasztva tört TEM (FF-TEM), krio-elektronmikroszkópia (cryo-EM).....	26
Dinamikus fényszóródás mérés (DLS) .....	27
Atomerő Mikroszkóp (AFM) .....	27
Számítógépes módszerek.....	27
Kvantumkémiai számolások (QM) .....	27
Dokkolások.....	28
Molekuladinamikai számítások (MD).....	28
Parametrizálás .....	29
Durva szemcsés szimulációk (CG-MD) .....	29
Sejtes vizsgálatok .....	30

Humáns sejtvonalas vizsgálatok.....	30
Antimikrobiális aktivitásvizsgálatok .....	30
Fluoreszcens mikroszkópia .....	30
Eredmények és diszkusszió .....	32
Természetes peptidek indukált másodlagos szerkezete.....	32
Magasabb szerveződések kialakulásához kapcsolt konformációváltozás – elvi megfontolások .....	32
Két komponensű rendszerek elméleti vizsgálata (D1).....	33
A lizofoszfátidsav hatása peptidszekvenciák térszerkezetére (D2).....	38
Quorum érzékelő molekulák szupramolekuláris asszociátumai (D3) .....	42
AMP-k magasabb szintű szerveződése endogén vegyületekkel (D4).....	45
Három komponensű rendszerek kialakulásának szimulációs és kísérletes vizsgálata (D5, D6).....	53
Biológiai aktivitás és mögöttes mechanizmus (D7) .....	59
Nem természetes peptidek.....	64
$\beta$ -peptidek asszociátumai .....	65
Membránaktív oligomerek vázszerkezete - kezdeti elméleti számolások (D8) .....	65
Membránaktív rendszerek dinamikus asszociátumai (D9) .....	70
Lamellin $\beta$ -peptidek környezetérzékeny asszociációja (D10) .....	76
Triazol foldamerek kezdeti vizsgálata .....	85
Alapvető szerkezeti elemek, triazol aminosavak szerkezeti tulajdonságai (D11).....	85
Szubsztituált 5Tzl aminosavak és azok szerkezeti preferenciája (D12).....	89
Hosszabb triazol foldamerek, egyszerűbb asszociátumok (D12, D13, D14) .....	92
Összefoglalás és kitekintés .....	98
Kitekintés.....	103
Az értekezés alapját adó közlemények .....	105
Kapcsolódó közlemények.....	106
Egyéb közlemények.....	108
Köszönetnyilvánítás.....	121
Irodalomjegyzék.....	112

## Rövidítések jegyzéke:

ACPC, ((R,R)-trans-2-aminociklopentán-karbonsav)

AFM, atomerő-mikroszkóp

AMP, antimikrobiális peptid

AMR, antimikrobiális rezisztencia

AmTH, amaránt

APC, (3S,4R)-trans-3-aminopirrolidin-4-karbonsav

ATR, csillapított teljes reflexiós (attenuated total reflectance)

$\alpha$ -peptid,  $\alpha$ -aminosavakból álló peptid

$\beta$ -peptid,  $\beta$ -aminosavakból álló peptid

CBD, kalmodulin kötő motívum, calmodulin binding motif

CD, cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

CE, Cotton-hatás, Cotton effect

CF-SPPS, áramlásos szilárd fázisú peptidszintézis, continuous-flow solid phase peptide synthesis

CFC, Couette-áramlásos cellarendszer, Couette flow cell

CFU Colony forming unit

CG, durvaszemcsés szimuláció, coarse-grained simulation

CL, kardiolipin

CPP, sejtekbe bejutó peptid, cell penetrating peptide

CuAAC, réz-katalizált azid-alkin cikloaddíciós reakció

DBU (1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-én),

DLS, dinamikus fényszórás (dynamic light scattering)

DMD, dinamikus molekuladokkolás protokoll

DMF, dimetilformamid

DOPC, 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-foszfatidilkolin

DOPG, 1,2-dioleoil-*sn*-glycero-3-foszfatidil-glicerol

DOSY, Diffusion ordered spectroscopy, diffúziókontrollált spektroszkópia

DRAMP, antimikrobiális peptidek adattára, data repository of antimicrobial peptides

DSSP, fehérjék másodlagos szerkezetét meghatározó algoritmus, define secondary structure of proteins

FF-TEM, fagyasztva töréssel kombinált transzmissziós elektronmikroszkópia

flow-LD, folyadék fázisú lineáris dikroizmus spektroszkópia

Fmoc, 9-fluorenil-metoxi-karbonil  
FT-IR Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia  
HDP, gazdavédő peptid, host defense peptide  
IEFPCM, integral equation formalism polarizable continuum model  
IM, belső membrán  
IR, infravörös spektroszkópia  
krio-EM, krio-elektronmikroszkópia  
LD, lineáris dikroizmus spektroszkópia  
LPA, lizofoszfatisav, lysophosphatidic acid  
LPS, lipopoliszacharid, lipopolysaccharide  
MBD membrán kötő domén, membrane binding domain  
MD, molekuladinamika  
MLV, többlamellás liposzóma, multi-layered vesicle  
MOA, működési mechanizmus, mechanism of action  
NMR mágneses magrezonancia spektroszkópia  
NOESY, mag Overhauser hatás spektroszkópia, nuclear overhauser effect spectroscopy  
OM, külső membrán  
PBS, foszfát puffer, phosphate-buffered saline  
PC, 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-foszfatidilkolin  
PEHS, potenciális energia-hiperfelület  
P<sub>i</sub>, foszfát ion, inorganic phosphate  
PG, foszfatidil-glicerol, 1,2-dioleoil-*sn*-glycero-3-foszfatidil-glicerol  
PQS, pseudomonas quorum signal  
PS, foszfatidil-szerinek  
QM, kvantummechanika  
ROESY, rotational frame nuclear Overhauser effect spectroscopy  
RuAAC, rutenium-katalizált cikloaddíciós reakció  
SAXS, kisszögű röntgenszórás, small-angle X-ray scattering  
TEM, transzmissziós elektron mikroszkópia  
TFA, trifluorecetsav  
TOCSY, totál korelációs spektroszkópia, total correlation spectroscopy  
TRIS, tris(hidroxi-metil)-amino-metán  
TZ, tartrazin  
4Tzl, 1,4-szubsztituált 1,2,3-triazol aminosav

5Tzl, 1,5-szubsztituált 1,2,3-triazol aminosav

UV, Ultraibolya

## Bevezetés

---

A biológiai rendszerek természetes velejárója a molekuláris szintű szerveződés, mely mikroméretű morfológiákon keresztül képes felépíteni sejt szintű szerveződések szkeletális-, transzport- és reprodukciós alapjait. Fehérjék esetén számos természetes példát találunk filamentumok, valamint mikrométeres objektumok felépítésére. A fehérjék „kisebb testvérei” a peptidek is képesek önszerveződésre, ám ezek esetében – a neurodegeneratív betegségek kapcsán világhírűvé vált amiloid alakzatokon felül- jóval kevesebb természetes funkcióval is rendelkező molekuláris felépítmény ismert. Ennek oka elsősorban abban keresendő, hogy kisebb lánchosszuk miatt gyakran csak rövidebb időtávú, tranziensebb funkciót láthatnak el, és ehhez megfelelő molekuláris kölcsönhatásokat alakítanak ki, melyek nehezebben nyomon követhetőek. Pedig önszerveződő peptidekből felépített mesterséges morfológiákat nagyon sokat találhatunk az irodalomban. Ugyanakkor peptidek más biológiailag releváns kismolekulákkal történő kölcsönhatásuk során kialakuló asszociátumaik még kevésbé ismertek. A természetes peptidek mellett ugyanezen szerveződési szintek megjelennek nem természetes, vagy mesterséges aminosavakból felépülő peptidek esetében is, azonban ennek feltérképezése még mindig gyerekcipőben jár.

Jelen dolgozat keretében a fenti témakört kísérlem meg körbejárni három szorosan ide kapcsolódó terület mentén. Az első a természetes peptidrendszerek magasabb szintű szerveződéséhez kapcsolódó kezdeti vizsgálatainkat, a második a természetes peptidek homológjának tekintett  $\beta$ -peptidek ön- és más molekulákkal történő „társ-szerveződését”, a harmadik rész pedig az egzotikusabb peptidrendszerek és azok asszociátumainak jobb megértése felé tett korai lépéseket foglalja össze. A modern tudományművelés azonban ma már megköveteli, hogy a felfedező kutatásainknak lehetőleg kézzelfogható praktikus kifizetése is legyen. Éppen ezért –a szerkezeti ismeretek bővítése mellett- a részletezett kutatások mind az antimikrobiális hatású peptidekre fókuszálnak, illetve olyan konstrukciókra, melyekkel új, makroszkópikus antimikrobiális rendszereket remélhetünk.

Ez a dolgozat azonban nem csupán szakmai eredményekről szól. Ezeket egy csapatnyi kutató másfél évtizedes munkája szülte, az ő munkájukat gyakran nem tudom kellőképpen hangsúlyozni. Pedig a közösen töltött kutatómunka adja a savát-borsát a minennapoknak, ettől lesz az eredmény az, ami és ettől égnek be a memóriánkba bizonyos momentumok egy életre az egyes kéziratok kapcsán. A közös munka legkifejezőbb pillanatait igyekszik elkapni egy-egy rövid idézet – ahogy én emlékezem rájuk.

## Irodalmi áttekintés

### Természetes peptidek

A természetben előforduló peptidek közül a dolgozat keretén belül elsősorban a hatásukat biomembránokon kifejtő úgynevezett antimikrobiális peptidekre fókuszálok. Ezen rendszerek egyszerre lehetnek növényi-, állati- és humán eredetűek, valamint szintetikus –tipikusan természetes eredetűekből származtatott szekvenciák. Tekintettel a dolgozatban egyszerre szereplő természetes és egzotikus aminosavakból álló peptidrendszerekre, az egyszerűség kedvéért természetes peptideknek a természetben legáltalánosabban előforduló  $\alpha$ -aminosavakból álló peptideket nevezem, míg nem természetes peptideknek a fentebb említett egzotikus aminosavakból álló peptideket. Ez alapján a szintetikus, de  $\alpha$ -aminosavakból álló peptidek is „természetesek”, pedig a természetben nem találhatók meg; az ilyen mélységű különbségtétel –bár szakmailag pontos-, az olvasást nehezíti, így nem láttam indokoltnak.

#### Építőelemek, konformációs variabilitás

Természetes peptidek esetén az aminosavak téralkatából következő főbb másodlagos szerkezeti elemek közül kiemelendő a leggyakoribb  $\alpha$ -hélix (vagy  $3_6$  hélix), valamint a második leggyakrabban előforduló ún.  $\beta$ -redős szerkezet. Az ezekhez kapcsolható aminosav gerincet jellemző  $\phi$  és  $\psi$  torziós szögek jól meghatározottak, mind kísérleti eredmények, mind elméleti számítások alapján:  $\alpha$ -hélixek esetén rendre  $\sim -55^\circ / -45^\circ$ ,  $\beta$ -redőkre pedig  $\sim -135^\circ / 135^\circ$  (Ramachandran et al. 1963; Perczel et al. 1991). Ezeken felül további szerkezeti elemek is jól megkülönböztethetőek pl. jól definiált fehérjeszerkezetekben kialakult elemekként (Berg 2022). Ugyanakkor rendezetlen fehérjérszletekben, vagy különálló rövidebb aminosavláncú peptidek esetén az ezen részletekre inherensen jellemző konformációs flexibilitás dinamikusabb téralkatokat eredményezhet, mely során az aminosavak torziós szögei is szélesebb skálán mozoghatnak. Ez eredményezi, hogy pl. a fehérjékben kialakuló  $\alpha$ -hélixek elején gyakran találhatók ún.  $3_{10}$  hélix motívumok és a két helikális szerkezet közötti átmenet rövidebb peptidek esetén kevésbé azonosítható. Ezért is mondható el az ide kapcsolódó szerkezeti irodalomról, hogy rövidebb peptidek esetén a másodlagos szerkezetek részletekbe menő tárgyalása nem jellemző (Owji et al. 2018; Iglesias et al. 2024; Ma et al. 2024).

#### Peptidek és fehérjék, a két csoport közötti különbség

A természetes biológiai építőkövek közül az aminosavak alkotják a fehérjeláncokat, és azok rövidebb tagjait, a peptideket. Ezen peptidkötéssel felépülő aminosavakból álló polimer- és

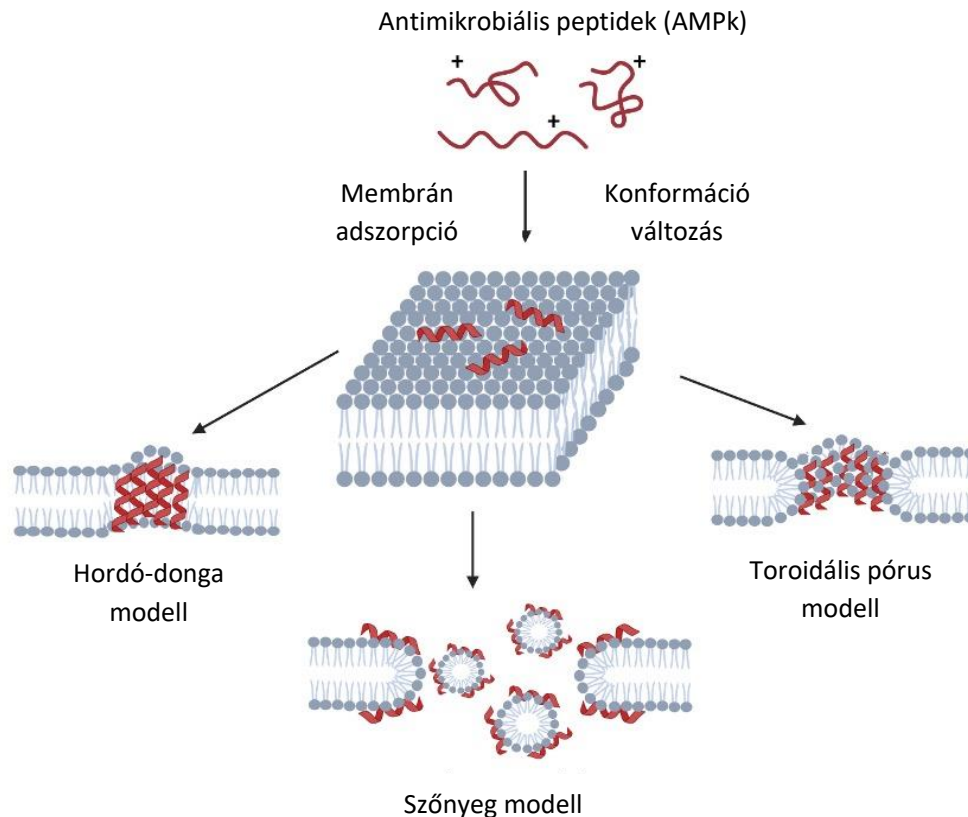
oligomer rendszerek elsődleges -szekvenciális- szerkezetétől elsősorban a peptidcsoportok által kialakított hidrogén-híd kötéseknek köszönhetően jutunk el a másodlagos szerkezetekhez. Míg ezen másodlagos szerkezeti elemek asszociációja a fehérjeláncokban a feltekeredés során változatos harmadlagos szerkezetekhez jut el a molekulának három dimenziós alakot adva, addig peptidek esetében a folyamat legtöbbször megáll egy másodlagos, vagy részlegesen rendezett szerkezetnél. Általánosan a koncentráció, vagy egyéb külső paraméter növelésével az egyedi peptidek önrendeződési folyamatok során képesek magasabb szerveződési szinteket elérni, azonban – a fehérjékkel ellentétben- a kialakult asszociátumokban a másodlagos szerkezeti elemek az egyes peptidek belső fizikai-kémiai tulajdonságai alapján javarészt ugyanazt a másodlagos szerkezetet veszik fel, így peptidek magasabb rendű asszociátumai csak mérsékelten tükrözik a fehérjék során tapasztalt komplex harmadlagos téralkatot. Ez többek között azért is lényeges, mert a peptid és a fehérje, mint két *termini technicus* már nem egzakt definíció, és a határvonal különböző megfontolások alapján más fontos pontok mentén húzódhat. Az aminosavsorrend hossza alapján tipikusan az 50 aminosavnál rövidebb láncokat tekintjük peptideknek, az azoknál nagyobbakat fehérjéknek. Ugyanakkor, a szerkezeti megkülönböztetés során a fehérje és peptidek közötti különbség előbbi megnövelt harmadlagos szerkezeti affinitása, míg utóbbi csak tipikusan más különálló spécieszekkel kölcsönhatva képes feltekeredett térszerkezetet létrehozni (Haney et al. 2019). Ez a jelenség gyakran párosul a molekula által betöltött funkció mentén történő kategorizálással. Általános a biológiai hatás alapján történő csoportosítás, mely során ugyan még gyakran szerepel kritériumként bizonyos aminosavak jelenléte, azok eloszlása, a tipikus szerkezeti tulajdonságok felsorolása, ám jóval nagyobb szerepe lesz a detektált biológiai hatásnak, amely alapján végül a kategória megszületik. Ilyen kategória a dolgozat számára releváns *antimikrobiális peptid* csoport is, ahol a fehérjék és peptidek elválasztása is elmosódik, hiszen pl. antimikrobiális tulajdonsággal rendelkező kisfehérjék is gyakran ide kerülnek besorolásra (Haney et al. 2017). Vegyük észre, hogy így praktikus szemmel nem gabalyodik össze a gondolatmenet azon a szerkezet-alapú megközelítésen, ami alapján egyes irodalmi példák egy 20 aminosavas -ám harmadlagos szerkezetű- rendszert mini-fehérjének, míg egy több, mint 70 aminosavas, de csak részlegesen rendezett, funkciójában antimikrobiális molekulát peptidnek aposztrofálnak.

## Antimikrobiális peptidek

A fent említett általános halmaz egy szűkebb területe az ún. antimikrobiális peptidek (AMP-k). Ezek a vegyületek létfontosságúak, amelyeket mind egysejtű, mind többsejtű organizmusok állítanak elő leggyakrabban a gazdaszervezet (host) védelmére a patogén mikroorganizmusok ellen (Giuliani et al. 2007; Seo et al. 2012; Li et al. 2012; Lewies et al. 2019; Mercer et al. 2020). A területen végzett átfogó kutatások mennyiségét illusztrálja az Antimikrobiális Peptidek Adattára (DRAMP) amelyben a bejegyzések száma, jelenleg több, mint 30 000. Ezek közül 5800 fölött a természetes és mesterséges AMP, 6000-nél több a specifikus AMP, majd 18 000 a szabadalmaztatott szekvencia, és 96 AMP előklinikai vagy klinikai fejlesztési szakaszban van. Ezek többsége antibakteriális, gombaellenes, vírusellenes és rákellenes peptid (Ma et al. 2025). Az AMP-k úgy tűnik, hogy az evolúciós időskálák során hatékonyak maradtak számos kórokozó szervezettel szemben, az egyre növekvő érdeklődést irántuk pedig az antimikrobiális rezisztencia fenyegetése miatt tapasztaljuk. Mint fentebb már említettem, az antibiotikum-rezisztencia az utóbbi időben riasztó szinteket ért el, és az egyik legnagyobb jelenlegi globális egészségügyi fenyegetést jelenti. Az AMP-k itt több szempontból is ígéretes megoldásnak tűnnek a kismolekulás irányokhoz képest, mivel talán lassabban alakul ki ellenük a rezisztencia, és egyaránt képesek széles spektrumú és specifikus antimikrobiális hatást kifejteni (Hancock et al. 2016). Maguk a természetes AMP-k, amiket szoktak gazdavédő peptideknek is nevezni (Host Defense Peptides, HDP), jellemzően rövid szekvenciájúak (12–50 aminosav), rendszerint keverten tartalmaznak kationos, és hidrofób régiókat, ami amfipatikussá és membránaktívvá teszi őket. Az AMP-k fontos elemei a veleszületett immunrendszernek, azonban szerepet játszanak a szerzett immunfolyamatok modulálásában is. Hatásukat elsősorban a célmembrán integritásának megsértésével, vagy egyes sejtfunkciók gátlásával érik el (Brogden 2005). Az összetevők elsődleges funkcióján túl, a kemotaxis és a sebgyógyulás folyamatait is modulálják (Mangoni and Casciaro 2020). Sokféleségük miatt a megfelelő osztályozás kihívást jelent, jelen tanulmány kereteihez illeszkedően a legelterjedtebb szerkezet szerinti osztályozást mutatom be röviden. Itt a kategorizálás a másodlagos szerkezeti motívum alapján történik, és négy fő osztály azonosítható. Ezek az  $\alpha$ -hélix vagy  $\beta$ -redő másodlagos szerkezeti elemek jelenléte vagy hiánya alapján a következőképpen alakulhat: (I) AMP-k lineáris  $\alpha$ -hélix szerkezetekkel; (II) lineáris kiterjedt szerkezetek (általában olyan aminosavakban gazdagok, mint a Gly, Arg, Trp, His vagy Pro); (III)  $\beta$ -redő tartalmú peptidek, amelyek gyakran egy vagy több diszulfid híd által stabilizáltak; (IV) peptidek, amelyek  $\alpha$ -hélixet és  $\beta$ -redőzött motívumokat is tartalmaznak. Más peptideket, amelyek nem tartoznak a négy előző osztályba, ideértve a

ciklikus és diszulfid-gazdag AMP-kat, valamint bonyolultabb topológiákat -, mint pl. a lasso peptidek- gyakran külön osztályként kezelünk (Koehbach and Craik 2019). A legnagyobb csoport az  $\alpha$ -hélix szerkezetű AMP-k osztálya. Ehhez tartozik a méhméregből származó melittin, vagy a cecropia molylepke által termelt Cecropin A. A CM15 e két peptid hibrid származéka, szekvenciája KWKLFKKIGA-VLKVL) a természetes cecropin A és melittin (cecropin A (1-7)-melittin (2-9) amid), amelyet úgy terveztek meg, hogy megőrizze az előbbi antimikrobiális tulajdonságait, de hiányozzon belőle utóbbi hemolitikus aktivitása (Andreu et al. 1992). Ide tartozik még az LL-37 nevű humán peptid is (Dürr et al. 2006). Hatásmechanizmusukat (mechanism of action, MOA) részletesebben megvizsgálva láthatjuk, hogy a membrán sérülés általi közvetlen sejtelpusztítás valószínűleg az AMP-k széles körben ismert és legjobban tanulmányozott toxikus hatása. A membránzavar általában különböző folyamatok kaszkádját indítja el pl. a baktériumok esetében. Az első kezdeti lépést az elektrosztatikus vonzás vezérli a pozitívan töltött AMP-k és a célbaktériumok negatív töltésű külső membránja között. A Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok külső felületén lipoteikosavak és lipopoliszacharidok találhatóak, amelyek negatív töltésűek, és ezért molekuláris szinten valószínűsíthető, hogy ezek lépnek direkt kapcsolatba először az AMP-kkel. Ezután a peptidek hozzákapcsolódnak és felhalmozódnak a membrán felületén. Ez gyakran szintén elektrosztatikus kölcsönhatások révén történik, mivel a baktérium többi lipid komponense is főként negatív töltésű, mint például a foszfatidil-glicerolok (PG), foszfatidil-szerinek (PS) vagy kardiolipinek (CL). A következő szinten általában valamilyen tranziens oligomerizáció is jelentkezik, ahol több irányt is sikerült azonosítani: Egyes peptidek transzmembrán pórusok kialakulását idézik elő, például a hordó-donga (barrel-stave), vagy a gyűrű-pórus (toroidal pore) modellek szerint (1. ábra). Mindkét modellre jellemző, hogy a peptidek merőlegesen orientálódnak a membrán felszínéhez képest, és az arra történő adszorpció során konformációváltozáson mennek keresztül. A membrán szétesését az AMP-k transzmembrán pórusképzés nélküli mechanizmusok révén is elérhetik, erre az egyik leginkább ismert mechanizmus az ún. szőnyeg modell (carpet mechanism). Azok a peptidek, amelyek e modellen keresztül fejtik ki funkciójukat, a membrán felületével párhuzamosan felhalmozódnak és szőnyegszerűen fedik azt le. Így, ha eléri a megfelelő méretű lefedettséget, a membránt egy detergensszerű hatással szedik szét. A teljesség igénye nélkül csak ezt a néhány modellt említem a sok bizonyított vagy felvetett AMP-k membránhoz kapcsolódó működési mechanizmus közül. Fontos megjegyezni azonban, hogy a legtöbb ilyen mechanizmus nem zárja ki egymást, és valószínűbb, hogy fenti mechanisztikus események párhuzamosan, szinergikus módon is lejátszódhatnak, illetve egyes AMP-k esetén

változhatnak is, pl. a célmembrán összetételének függvényében (Kumar et al. 2018; Avci et al. 2018; Tornesello et al. 2020).



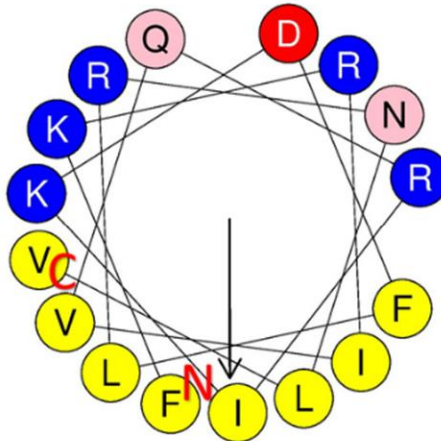
1. ábra AMP-k főbb membránkapcsolt mechanizmusai (az ábra a <https://biorender.com/> -on készült)

### Membránaktív peptidok térszerkezetváltozása

A fentebb említetteknek megfelelően a peptidok -rendezetlen fehérjérszletekkel analóg módon- számos esetben képesek külső hatásra meghatározott szerkezetet felvenni, mely tulajdonképpen egy véletlenszerű szerkezetből általában egy jól azonosítható másodlagos szerkezetbe történő konformációváltozás. Jelen tanulmányban a biológiai membránok felé nagy affinitást mutató antimikrobiális peptidok állnak a középpontban, ezért a külső hatások terén kiemelkedő jelentőségű a membránfelülettel való érintkezésük hatása a térszerkezetre (1. ábra). Mára ismert az AMP-k esetében, hogy amfipatikus jellegüket tipikusan a lipid kettősréteghez kapcsolódva érik el, mely során a szekvenciában levő aminosavak orientálódnak a membrán-víz dinamikus határfelület hidrophil, illetve hidrophób részeihez. Ezen jelenség praktikus szemléltetőeszköze hélix formáló peptidok esetén a helikális kerék ábrázolás (Helical wheel model), vagy Edmundson ábrázolás (Schiffer and Edmundson 1967),

melyen az elrendezés, valamint az aminosavak minőségét jelző színkód gyorsan átlátható módon prezentálja a fent részletezett aminosav-orientációt (2. ábra).

**FK-16**  
FKRIVQRIKD FLRNLV



2. ábra Az FK-16 antimikrobiális peptid helikális kerék-modellje. C- és N-terminális aminosavak piros C,N; a hélixben található hidrofób momentum fekete nyíl.

Peptidek szerveződése, oligomerizáció, asszociáció

A peptidek önszerveződése mindennapos jelenség, melyet a természet felhasznál számos természetes biológiai funkció során, valamint tervezett szekvenciákon keresztül egyre növekvő számú alkalmazást láthatunk az anyagtudomány és biotechnológia határterületein. Ezeket az asszociációs folyamatokat a legtöbb esetben másodrendű, nem-kovalens kölcsönhatások irányítják. A peptidek önszerveződése különféle nanostruktúrák, például nanocsövek, fibrillumok, vezikulák és hidrogélek kialakulásához vezethet, amelyek között mára antimikrobiális hatású rendszerek is megjelentek (Levin et al. 2020; Payne et al. 2021; Zhang et al. 2010).

A peptidek önszerveződésének egyik alapvető kiindulási eleme a  $\beta$ -szál és az  $\alpha$ -hélix. A szálakból kialakított  $\beta$ -redőzött réteget felvevő peptidek –például amiloid-szerű szekvenciák esetében– gyakran fibrilláris hálózatokat alkotnak, míg az amfipatikus  $\alpha$ -hélix szerkezetűek micellás vagy vezikuláris szerkezetekbe aggregálódhatnak, vagy asszociálódhatnak.

*Itt egy pillanatra időzzünk el az aggregáció és az asszociáció fogalmak használatán. Míg az aggregáció egy elsősorban véletlenszerű, kaotikus rendeződést takar, addig az asszociáció inkább kontrollált folyamatok összességére utal. Ugyanakkor az aggregált rendszerek esetén inkább a magasabb felbontású belső rendszer szerkezeti ismeretének hiánya az ami arra vezet*

*minket, hogy az adott molekulahalmazt aggregátumnak nevezzük. További kérdés, hogy mely szerkezeti szintű rendezettségben innen, vagy túl nevezünk valamit aggregátumnak vagy asszociátumnak? Az ide kapcsolódó tanulmányainkban kimutattuk, hogy az AMP-k esetében mikrométeres elágazásos rendszerek alakulhatnak ki -elsősorban más molekulákkal alkotott kezdeti komplexképzés, majd azok asszociátumokba történő rendeződése során. Ezen folyamatokban megfigyelhető, hogy az AMP-k rendezetlen szerkezetből pl. helikális, vagy redőzött rétegű másodlagos szerkezetet alkotnak, ám a makroszkópikus rendszereken az elágazásokban már nehéz egyértelmű molekuláris szisztémát azonosítani. Ezeket jobb híján részlegesen rendezett aggregátumokként (semi-structured aggregate) jellemezzük, ugyanakkor az elnevezés ugyanúgy a bekezdés elején felvetett bizonytalanságon alapul, mint az aggregátum és asszociátum kifejezés váltott használata. Az olvasó idegeit tovább nem borzolva, jelen tanulmányban az asszociátum és aggregátum kifejezéseket felváltva alkalmazom, inkább szinonimaként, semmint jól elhatárolható különbségeket jelezve.*

Visszatérve a  $\beta$ -szál és helikális szerkezetek felvételének képességéhez, ezen tulajdonság különösen fontos az AMP-k esetében, mivel az aktuális konformációjuk meghatározza a mikrobiális membránokkal való kölcsönhatásukat (Nguyen et al. 2011). Az AMP-k önszerveződési képessége lehetővé teszi számukra, hogy pórusokat képezzenek a mikrobiális membránokban, ami a sejtek pusztulásához vezethet (Matsuzaki 2009). Korábbi alfejezetekben már taglalásra került, hogy számos antimikrobiális peptid, például a defenzinek és a cecropinek, dinamikus szerkezeti átalakulásokat mutatnak a bakteriális membránokkal való kölcsönhatás során. Egyes AMP-k, mint például az LL-37 és a melittin, oligomer aggregátumokat képezhetnek, amelyek fokozzák antimikrobiális hatékonyságukat (Jiang et al. 2008; Engelberg and Landau 2020). Ezenkívül az önszerveződés befolyásolhatja az AMP-k szelektivitását, lehetővé téve számukra, hogy előnyösen a mikrobiális membránokat célozzák meg, miközben megkímélik az emlőssejteket. Az újabb kutatások a szintetikus, önszerveződő AMP-k tervezésére összpontosítanak terápiás alkalmazások céljából, hogy növeljék azok stabilitását, biohasznosulását és kontrollált felszabadulását. A peptidök önszerveződő nanostruktúrákká történő összeállását emellett új gyógyszerhordozó rendszerek és antimikrobiális bioanyagok fejlesztésére is felhasználják (Lam et al. 2016). Összességében a peptidök önszerveződése kulcsszerepet játszik az antimikrobiális peptidök hatásmechanizmusában, meghatározva szerkezetük és funkciójuk összefüggéseit, valamint potenciális alkalmazásaikat az anyagtudományi és az orvosi biológiai területeken.

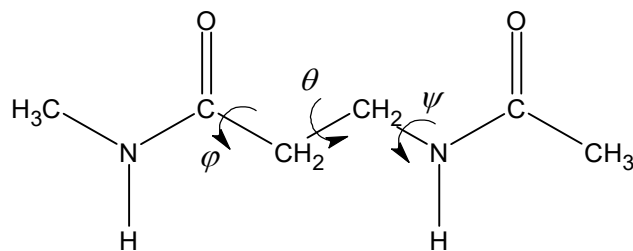
## Nem természetes peptidek

A természetes aminosavakból felépülő peptidek mellett számos olyan -szintetikus – rendszert ismerhettünk meg az elmúlt évtizedekben, melyek csak nem természetes aminosavakból és aminosavakból származtatott egységeket tartalmazó rendszerek, pl. peptidomimetikumok, foldamerek, tervezett ciklusos régiókat tartalmazó peptidek (Seebach et al. 2004; Goodman et al. 2007; Nizami et al. 2019; Li Petri et al. 2022). Ezek kategorizálása igen sok paraméter mentén történik, az ezeket vizsgáló tanulmányok dedikált irányainak megfelelően. Összefoglaló kifejezésként jelen dolgozatban fenti molekulacsaládot nevezem nem természetes peptideknek. Ide sorolhatóak a természetes aminosavak hosszabb homológjaiból felépülő peptidek, pl. a  $\beta$ -peptidek,  $\gamma$ -peptidek, vagy  $\delta$ -peptidek, melyek rendre csak  $\beta$ -,  $\gamma$ -, vagy  $\delta$ -aminosavakból épülnek fel. Ezen felül a molekulacsoport részét képezik azok a vegyes aminosavakból felépülő szintetikus peptidek is, melyekben a természetes aminosavak az előbb felsorolt aminosavakkal keverten alkotják a peptidszekvenciát. Az ide tartozó molekulacsoportok mára ismert közös jellemzője, hogy képesek másodlagos szerkezeti elemekbe feltekeredni, ezért az irodalom foldamerekként, vagy peptid foldamerekként is hivatkozik rájuk. Megjegyzendő, hogy ezen rendszerek közé általában nem soroljuk be a számos, természetben gyakran megtalálható specifikus aminosavakat is tartalmazó peptidet és egyéb vegyületeket, úgy mint vancomycin, acetil-koenzim-A, bacitracin, echinocandin B vagy  $\delta$ -tolaasin I. Kapcsolódó, de nem klasszikus peptidkötéseket tartalmazó külön rendszerek az ún. azapeptidek, peptoidok, vagy oligoureák. Tekintve, hogy jelen dolgozatban részleteiben  $\beta$ -peptidekkel, valamint módosított  $\delta$ -peptidekkel foglalkozom, ezért alább ezek lényegretörő áttekintése következik. A felépítést reprezentálandó a természetes peptidekre rövidítve  $\alpha$ -peptidekként is hivatkozom majd ( $\alpha$ -aminosavakból felépülő peptid).

## $\beta$ -peptidek

A  $\beta$ -peptidek állnak a legközelebb a természetes  $\alpha$ -peptidekhez (3. ábra). A természetes  $\alpha$ -peptidektől – azok homológjaként - a peptidgerincben található plusz metilencsoport különbözteti meg őket. Az így megnövelt aminosavhossz egy további torziós szöveget is eredményez építőelemenként, ami növeli ezen rendszerek konformációs szabadságát, és számos programozható másodlagos szerkezet elérését teszi lehetővé (Cheng and DeGrado 2001; Seebach et al. 2004; Goodman et al. 2007). Ezenkívül proteolitikusan stabilak, ezért természetes peptidek helyettesítőiként is gyakran kerülnek alkalmazásra (Hintermann and

Seebach 1997; Seebach et al. 1998). Kimutatták, hogy proteolitikus rezisztenciát mutatnak erős peptidázokkal szemben (pl. proteináz K), ahol akár 48 óra után is épen maradtak a szekvenciák, míg az analóg  $\alpha$ -peptidek 15 percen belül teljesen lebomlottak. Több példa mutatja, hogy a  $\beta$ -peptidek farmakokinetikája is előnyös, eliminációs felezési idejük 3-10 óra, szemben az analóg természetes peptidek kevesebb mint 15 perces felezési idejével (Seebach et al. 1998). A  $\beta$ -peptidek másodlagos szerkezetükkel ígéretesnek bizonyultak számos biológiai alkalmazásban, beleértve az RNS-receptor kötődést, a szomatosztatin receptor kötődést, valamint a koleszterin felszívódásának gátlását.



3. ábra. A legegyszerűbb  $\beta$ -aminosav, a  $\beta$ -alanin ( $\beta$ -homo-glicin) peptidkötésekkel védve, és annak három fő torziós szöge

$\beta$ -peptidek elsődleges szerkezeti tulajdonságai

Az  $\alpha$ -aminosavakban a konformációt két torziós szög,  $\varphi$  és  $\psi$  segítségével ábrázolják. A  $\beta$ -aminosavak gerincében egy további torziós szöget,  $\theta$  is azonosíthatunk, amely a két fenti klasszikus szöget elválasztja egymástól, ezzel befolyásolva a lokális torziós preferenciákat, így kiterjesztve az energetikailag hozzáférhető konformációs teret (3. ábra). A  $\beta$ -peptideken elérhető szubsztitúciós mintázat is változatosabb, mint  $\alpha$ -analógjaiké; az aminosavak lehetnek mono- vagy di-szubsztituáltak, vagy részei egy gyűrűs rendszernek. A három diéderes szög egy 3D Ramachandran diagramot eredményez, melynek energetikai leírása során már a negyedik dimenzióba és át kellene lépni, ezért alkalmazunk gyakran csak 2D-s vetületeket a kérdéses torziós szögek mentén.

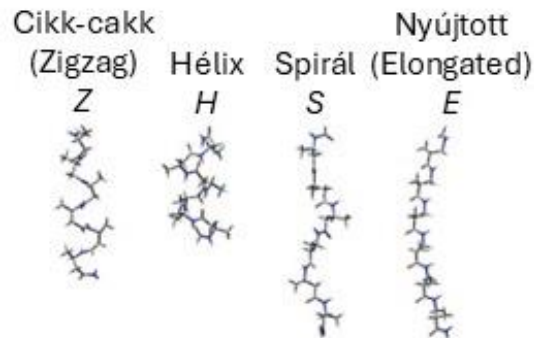
A  $\beta$ -peptidek képesek számos másodlagos szerkezetet felvenni, mint például helixek,  $\beta$ -szálak, kanyar (turn) konformációk, valamint kiterjesztett nyújtott szerkezeteket. Ezeket a természetes peptidekhez képest rövidebb lánchosszúság esetén is ki tudják már alakítani, jellemzően hexapeptid hosszúság felett már helikális szerkezetek is megjelenhetnek. Ez a feltekeredés hajlam igen tervezhetővé teszi a  $\beta$ -peptideket ami különösen fontos specifikus alkalmazások irányába.

Az egyik kulcsfontosságú tulajdonság, amely befolyásolja a peptidgerinc torziós szögének orientációját, és ezáltal a kialakuló magasabb szintű szerkezeti elemeket, a peptidgerinc sztereokémiai mintázata. A  $\beta$ -peptideknél a Seebach által jelentett oldalláncok kiralitásának hatása a feltekeredési preferenciákra a következőképpen alakul: i) heterokirálisan (vagy „különböző”) diszubsztituált  $\beta$ -aminosav maradékok poláris láncokat alkotnak, ii) mono- vagy homokirálisan (vagy „azonos”) diszubsztituált származékok hajlamosak helikális szerkezetet kialakítani, iii) geminálisan diszubsztituált  $\beta$ -aminosavak valószínűleg nem alkotnak sem helixeket, sem lemezeket, mert a metilcsoportok akadályozzák a hidrogénkötéseket. Bár ezek az előrejelzések a legtöbb esetben érvényesek, mégis több kivétel is található, különösen a nem helikális konformációk esetében. Az alternatív másodlagos szerkezetek esetében a szekvenciában eltérő kiralitás különféle kombinációkat eredményezhet.

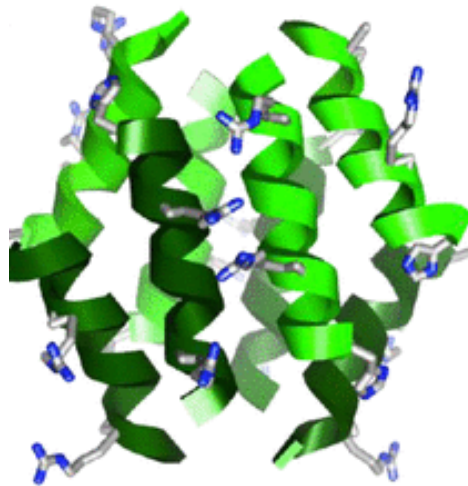
Másodlagos szerkezet, magasabb rendű szerkezetek, környezetfüggő konformációs polimorfizmus és kapcsolt bioaktivitás

Általánosságban négy különböző másodlagos szerkezeti motívum ismerhető fel a  $\beta$ -peptideknél: ezek a cikk-cakk (Z), helikális (H), spirális (S) és nyújtott (E) minták (4. ábra). Fontos megemlíteni, hogy az E és S másodlagos szerkezeti motívumok stabilitásukhoz nem igényelnek belső hidrogénkötéseket, míg a H és Z motívumokhoz legalább valamilyen típusú hidrogénkötések szükségesek. Itt érdemes röviden feleleveníteni a hasonló természetes peptidek szerkezeti tulajdonságait is. Az antimikrobiális peptidek (AMP-k) vizes fázisban döntően rendezetlen konformációt vesznek fel, de jelentős szerkezeti változásokon mennek keresztül amikor pl. patogén membránokkal lépnek kölcsönhatásba. Az adott szekvencián belül fellelhető analóg konformációs polimorfizmusról  $\beta$ -peptidek esetén viszonylag keveset tudunk, de néhány közeli példa, különösen asszociáció során bekövetkező szerkezeti változások esetén már fellelhető (Aguilar and Yarovsky 2024; Daniels et al. 2007; Wang and Schepartz 2016; Wang et al. 2014). Ehhez kapcsolódóan már több jól definiált magasabb rendű szerkezet is található az irodalomban, melyek leggyakrabban helikális  $\beta$ -peptidekbe precízen tervezett aminosav kombinációk hatására állnak össze pl. hélix kötegekké ( $\beta$ -peptide helix bundles) (Wang et al. 2014) (5. ábra). A magasabb szintű szerveződésekről, illetve azok folyamatosan bővülő alkalmazási területeiről egy viszonylag kurrens áttekintő tanulmányhoz irányítom az érdeklődőt (Aguilar and Yarovsky 2024). Bioaktivitásukat tekintve,  $\beta$ -aminosav egységeket tartalmazó sejtekbe bejutó peptideket (CPP) a Seebach és a Gellman csoportok már a 2000-es évek elején bemutattak (Appella et al. 1996; Seebach et al. 1996). Gellman

csoportja kifejlesztett olyan  $\beta^3$ -peptideket, amelyek a DNS-kötő fehérjékhez hasonlóan képesek áthaladni a sejtmembránokon, és a citoplazmában, valamint a sejtmagban lokalizálódnak (Umezawa et al. 2002). Ezek a  $\beta^3$ -peptidek, amelyek a Tat fehérje Arg-gazdag régióján alapulnak, nanomoláris affinitással kötődtek a TAR RNS-hez, amint azt fluoreszcens anizotrópia és elektroforézis vizsgálatokkal meghatározták, így potenciálisan akár anti-HIV terápiaként is alkalmazhatóak lehetnének (Gelman et al. 2003).



4. ábra.  $\beta$ -peptidek fontosabb másodlagos szerkezeti elemei



5. ábra Schepartz és kollegái által tervezett  $\beta$ -peptid hélixekből álló katalizátor oligomer (Wang et al. 2014)

A  $\beta$ -peptidek veleszületett szerkezeti rugalmassága és a környezetük alapján különböző szupramolekuláris önszerveződő struktúrák kialakítására való képessége érdekes jelöltté teszi őket terápiás alkalmazásokhoz. Ezek a peptidek általában amfifil helikális struktúrákba önszerveződnek, és több mutatott közöttük erőteljes antimikrobiális aktivitást Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumokkal szemben, miközben hemolitikus aktivitásuk alacsony. Gellman és munkatársai ciklikus APC ((3S,4R)-trans-3-aminopirrolidin-4-karbonsav) és

ACPC ((R,R)-trans-2-aminociklopentán-karbonsav) összetevőkből álló  $\beta^3$ -aminosavakból, illetve akár kevert  $\beta^2$ - és  $\beta^3$ -aminosavakból álló peptideket írtak le, amelyek javarészt helikális struktúrákat képeztek, és erőteljes antimikrobiális aktivitást mutattak (Arvidsson et al. 2001; 2003; Tew et al. 2010). Ezek a helikális  $\beta$ -AMP-k hatékonyak voltak több baktériumtörzs ellen, erős affinitást mutatnak a negatívan töltött lipidmembránok iránt, és membránlítikus hatásuk arra utal, hogy hasonlóan a természetes AMP-khez, a baktériumok membránjának roncsolásával érték el toxikus hatásukat.

A nem helikális konformációt generáló  $\beta$ -AMP-k, mint például a redőzött struktúrákat alkotó egységek, kevésbé kutatottak és a mechanisztikus aspektusok sem értettek teljes mértékben. Mosca és munkatársai amfifil kationikus  $\beta^3R3$ -peptideket terveztek, amelyek az  $\alpha$ - és  $\beta$ -peptidek szerkezeti jellemzőit ötvözik az amidkötések irányának változtatásával, és valószínűsíthetően inkább redőzött rétegre hasonlító másodlagos szerkezetet alkotnak, mintsem helikális téralkatot. Ezek a peptidek antimikrobiális aktivitást mutattak, különösen a Gram-pozitív baktérium, a *Micrococcus luteus* ellen, ugyanakkor hemolitikus aktivitásuk alacsony maradt (Mosca et al. 2014).

A fenti korai példákon felül azonban általánosan elmondható, hogy ma már több területen találhatóak alkalmazások, melyek egyre növekvő mértékben alapoznak a  $\beta$ -peptidek önrendeződő képességeire. Ezek között megtalálhatóak neurális sejtek növekedését, szövetek gyógyulását segítő molekuláris vázak (Kulkarni, Kelderman, et al. 2021; Motamed et al. 2019), gyógyszerek kontrollált kibocsátását segítő injekcióval bejuttatható hidrogélek (Kulkarni, Minehan, et al. 2021), vagy antimikrobiális nanofibrillumok is (Payne et al. 2021).

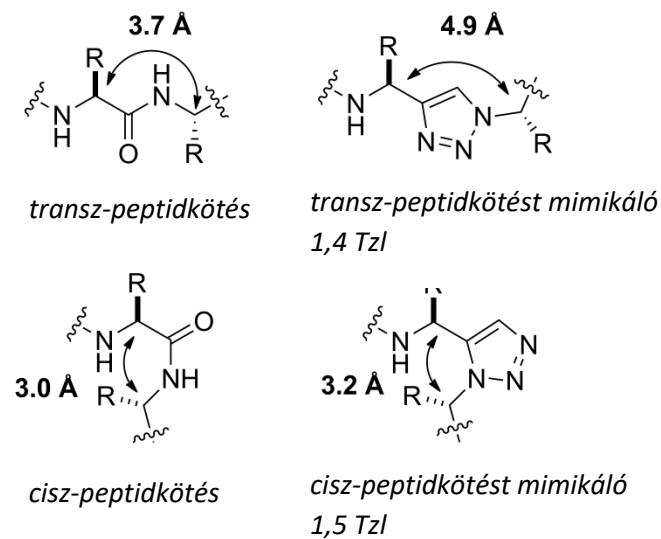
## Triazol foldamerek

Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -aminosavak homológ során továbbmenve a  $\gamma$ - és  $\delta$ -aminosavak következnek. Ez utóbbiak esetében már olyan meghosszabbított peptidlánccról beszélhetünk ahol még alkalmazható a hagyományos peptidkémiai kötések mentén történő szilárdfázisú peptidszintézis, azonban már speciális inzerciókkal akár más módon is előállíthatóak lehetnek a peptidláncok. Ez praktikus azt is jelenti, hogy itt pl. cikloalkil, aromás vagy heteroaromás vázra alapozott szintetikus aminosavak is alkalmazhatóak anélkül, hogy a láncközi ciklusos molekularészlet az aminosav által bejárható konformációs teret jelentősen leszűkítené. Az 1,4-diszubsztituált 1,2,3-triazolok, amelyeket a réz-katalizált azid-alkin cikloaddíciós (CuAAC) reakció révén könnyen hozzáférhetünk, (Holub and Kirshenbaum 2010) fenti gondolatmenet

praktikus példaként tartoznak a  $\delta$ -aminosavak közé. A CuAAC-hoz képest a rutenium-katalizált cikloaddíciós reakció (RuAAC) lehetővé teszi az 1,5-diszubsztituált 1,2,3-triazolhoz való hozzáférést, amelynek a karboxilsav és aminosav funkciók beépítésével szintén egy ciklust tartalmazó  $\delta$ -aminosavat érhetünk el (Johansson et al. 2014). Ez utóbbiak térbeli elrendezése azonban eltér a réz-katalizált reakció során kapott monomer egységekhez képest. Ezen reakciókat gyakran használják gyógyszerkémiai alkalmazásokban, beleértve akár egyéni aminosavak beépítését - ezáltal peptidomimetikumot kapva -, de a homo-oligomereikből felépülő peptid foldamerekről kialakult ismereteink eddig nagyon korlátozottak. Jelen dolgozat keretében az ezen CuAAC és RuAAC révén készített triazol monomerek konformációs tulajdonságainak, valamint az ezekből előállított  $\delta$ -peptidek másodlagos szerkezeteinek kezdeti feltérképező lépéseit foglalom össze, egyben kitekintek a jövőbeni lehetséges alkalmazásokra.

Triazolok, mint aminosav építőelemek peptidekben

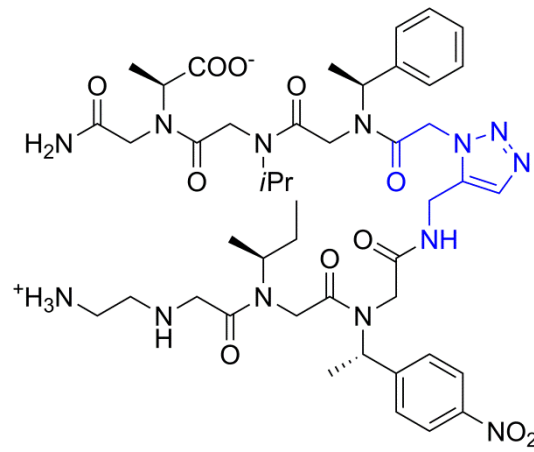
A triazol egység, mind az 1,4-, mind az 1,5-regioizomer, az elmúlt 10 évben nagyon népszerű építőelemmé vált a peptidomimetikumokban. Főleg azért, mert szerkezeti és elektronikai jellemzőik hasonlóak a peptidkötéséhez, de azért is, mert általános szintézismódszerek most már elérhetők a CuAAC (Rostovtsev et al. 2002; Tornøe et al. 2002) és RuAAC (Zhang et al. 2005) reakciók révén. A 1,4- és 1,5-triazolok jó analógjai a peptidkötéseknek, mivel sík alakúak, miközben erős dipólus- és H-kötési tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek utánozzák a peptidkötés jellemzőit.  $\delta$ -aminosavak esetében azt is látnunk kell, hogy a láncban levő nehézatomból száma épp megegyezik kettő normál aminosav nehézatomból számaival, így egy síkban elrendezett láncbéli kötés a peptidkötést mimikálhatja, praktikusán  $x/2$   $\delta$ -aminosav majd ugyanolyan hosszú peptidláncot alkot mint egy  $x$  tagszámú aminosavból álló természetes peptid. Az 1,4-subsztituált triazol jól utánozza a közönséges transz-peptidkötést, még ha a mellékcsoportok közötti távolságokat kissé meg is hosszabbítja (6. ábra). Ezzel szemben az 1,5-triazol jól mimikálja a kevésbé elterjedt cisz-peptidkötést, amely lehetővé teszi a kanyar (turn) másodlagos szerkezetet felvevő peptidomimetikum struktúrák kialakulását.



6. ábra. Az 1,4- és 1,5-triazolok összehasonlítása a transz- és cisz-peptidkötésekkel

A triazol aminosavak egyik legnagyobb előnye, hogy a természetes aminosavakkal ellentétben proteolitikusan és metabolikusan stabilak (Guarrochena et al. 2025). Ezen kívül az azid és az alkin prekursorok viszonylag inertnek tekinthetők, lehetővé téve akár az *in vitro* CuAAC reakciókat. Továbbmenve, alkinek és az azidok Huisgen-féle cikloadíciójának egyik praktikus fejlesztése lehetővé tette a biomolekulák szelektív *in vivo* jelölését élő egerekben is (Chang et al. 2010).

Az 1,4-szubsztituált triazolok esetében a nagymértékben egyedi inzerciók mellett néhány rövid homo-oligomer is leírásra került már (Angelo and Arora 2005; 2007; Ke et al. 2012; Montagnat et al. 2010). Az 1,5-szubsztituált triazol egységet viszont korábban nem használták annyira peptidomimetikumokként, mint a 1,4-izomert. Mindazonáltal néhány nagyon érdekes alkalmazást azonban itt is megfigyelhetünk, például hisztidint mimikáló szekvenciákban, vagy Vancomycinhez hasonló peptidomimetikumokban. A kanyar motívumokban történő alkalmazását az 7. ábra szemlélteti.



7. ábra. Az 1,5 szubsztituált triazol egy peptoid kanyar szerkezetben

## Módszerek

---

### Peptidek szintézise

A peptideket két féle módon szereztük be a kísérletekhez. A természetes peptideket kereskedelmi cégektől vásároltuk (NovoPro, China, EZ Biolab, USA, Bio-Science Kft.), melyek tisztasága nagyobb, mint 95% volt. A saját fejlesztésű  $\beta$ -peptideket áramlásos peptidszintézis módszerrel, szilárd fázison állítottuk elő. A kapcsolásokat 2 ekvivalens Fmoc-védett aminosavval végeztük. A reakciókat az optimalizált reakciós feltételek mellett végeztük 60 bar nyomáson, 70 °C hőmérsékleten, 0,15 mL/perc áramlási sebességgel. Az Fmocsoport hasítása esetén 2 mL 2% DBU (1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-én), 2% piperidin DMF-oldatot (dimetilformamid) használtunk. A peptid szekvenciákat a gyantáról 90% TFA (trifluoecetsav) + 5% víz + 2,5% triizopropilszilán + 2,5% dithiothreitol eleggyel szabadítottuk fel szobahőmérsékleten 3 órán keresztül. A TFA-t eltávolítottuk, majd a keletkezett peptideket lehűtött szárított dietiléterrel kicsaptuk. A kicsapott szabad peptideket leszűrtük, majd 10% ecetsavban oldottuk fel és liofilizáltuk.

A triazol aminosavakat szintén laborbán állítottuk elő, azok szintéziséhez mikrohullámú üvegcsébe N-Boc-propargilamint (627 mg, 4,0 mmol), metil 2-azidoacetátot (475 mg, 4,1 mmol) és 15ml THF-t tettünk, majd 48mg 0,16 mmol [RuCl<sub>2</sub>Cp\*] adtunk hozzá. Az üvegcsét lezártuk és nitrogénnel öblítettük át 1-2 percig. A reakciókeveréket 100 °C-ra melegítettük 20 percig mikrohullámú reaktorban. A reakciókeveréket egy fecskendőszűrőn átszűrtük. A nyers terméket flash kromatográfiával tisztítottuk szilícium-dioxidon (0 és 15% metanol gradienssel diklórmetánban), így nyertünk 1,03 g metil 2-(5-[(terc-butoxicarbonil)amino]metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetát(1)-t fehér szilárd anyagként, 96%-os hozammal.

### Szerkezetvizsgálat

#### Elektronikus cirkuláris dikroizmus (CD)

A másodlagos szerkezetek és a kezdeti asszociátum-képzéshez CD spektroszkópiát használtunk. A CD spektrumok rögzítését JASCO J-1500-as spektropolariméterrel végeztük, szobahőmérsékleten, 0,1, és 0,5 cm-es fényúthosszú kvarc küvetták alkalmazásával (Hellma USA). A peptidek és foldamerek CD adatait folytonos pásztázó módban, 190-350nm-es tartományban vettük fel. A mérések sebessége 50 nm/min, 0,5 nm-es lépésköz, 4 másodperces válaszüthő, 3 méréses összegzés, valamint 1 nm-es sáv szélesség alkalmazásával történt. Minden felvett CD görbe korrigálásra került az üres pufferoldatot tartalmazó spektrum felvételével és annak spektrális hozzájárulásának kivonásával. A természetes peptidek

esetében a másodlagos szerkezet százalékos tartalmának becsléséhez a BeStSel (Beta Structure Selection) nevű online elérhető alkalmazást használtuk (<http://bestsel.elte.hu>) (Micsonai et al. 2015).

#### Fluoreszcens spektroszkópia

A peptidek kölcsönhatásainak minőségét fluoreszcens spektroszkópiával is vizsgáltuk. A spektrumok felvétele egy Jobin Yvon Fluoromax-3 spektrofluoriméterrel történt, 25 °C fokon, PBS pufferben. A peptidek kölcsönhatásának vizsgálata során a triptofánok sajátfluoreszcenciáját használtuk, melyet 295 nm-en gerjesztettük és az emissziót 310 és 400 nm között detektáltuk. A kötődést a peptidek 1 µM koncentrációjánál vizsgáltuk, miközben a kötő partner kismolekula (pl. suramin) mennyiségét lépésenként emeltük 50 µM-ig. A liposzómák és a partner kismolekulák spektrális hozzájárulásának kivonásához felvettük a megfelelő, fluorofórt nem tartalmazó oldatok spektrumát. Minden titrálást kétszer ismételtünk, a megjelenített adatok átlagértékek szórással.

#### Folyadékfázisú lineáris dikroizmus (LD)

A lineáris dikroizmus spektroszkópia egy igen praktikus, ám hazánkban kevésbé ismert kiegészítő technika, amelynek különböző elemeibe itthon pl. Garab Győző (Szeged) iskolateremtő munkásságán keresztül kaphat jobb betekintést az érdeklődő. Ugyanakkor a folyadékfázisú LD speciális terület, melynek jobb megértéséhez egy valamelyest részletesebb leírás található a dolgozat végén a Függelékben. Itt – a technikai paramétereken felül – csak egy rövid összefoglaló áll, összhangban annak jelen dolgozatban betöltött kisebb szerepével. Az LD jel a síkban polarizált fény ortogonális formái közötti abszorpciós különbségként ( $A$ ) definiálható, ahol a beeső fénysugár polarizációs vektora párhuzamosan ( $A_{\parallel}$ ) vagy merőlegesen ( $A_{\perp}$ ) áll a minta orientációs tengelyére:

$$LD = A_{\parallel} - A_{\perp} \quad (1)$$

Az LD spektroszkópiátt olyan rendszerekben alkalmazzák, amelyek vagy eleve orientáltak, vagy a kísérlet során válnak orientálttá (Hicks et al. 2010; Nordén et al. 2010). Az LD jel adott hullámhossznál tapasztalt előjele és amplitúdója attól függ, hogy a fény milyen irányban halad át az orientált mintán. A 1. egyenlet alapján makroszkópiusan rendezett rendszerben a kromofórok pozitív LD jelet adnak akkor, ha az elektronikus átmeneti dipólusmomentum vektoraik javarészt a rendszer orientációs tengelyével egy irányban állnak, míg negatív, ha arra merőlegesek. A jelen dolgozatban szereplő kísérletek során oldatfázisú liposzómákat

tartalmazó mintákat vizsgáltunk, melyek orientálását nyíróáramlással értük el egy forgó Couette-cellás berendezésben, ami ellipszoid alakú részlegesen rendezett vezikulákat eredményez. Azok a peptidek, amelyek nem véletlenszerű módon kötődnek a lipidek felszínéhez, szintén orientálódnak, és átmeneti dipólusmomentumaik LD jelet adnak a 190–300 nm-es spektrális tartományban (Esbjörner et al. 2007; Svensson et al. 2007; Ardhmar et al. 2002). Az LD méréseket egy JASCO J-1500 spektropolariméteren végeztük 25 °C-on, amelyet Couette-áramlásos cellarendszerrel (CFC-573 Couette cellatartó, 0,5 mm-es úthosszú hengeres kvarc cella) szereltünk fel. A spektrumokat 200 és 500 nm között rögzítettük 100 nm/perc sebességgel, 0,5 nm-es lépésközönként, 1 s válaszüddővel és 1 nm sáv szélességgel. A mintákat 2270 s<sup>-1</sup> nyírási gradiens alatt orientáltuk, melyek PBS pufferben 50% szacharózt tartalmaztak. A nulla nyíróerő mellett felvett bázisvonalak minden spektrumból kivonásra kerültek.

#### NMR spektroszkópia

Az NMR méréseket egy Bruker Avance III 500 MHz spektrométeren végeztük, mely kriofejjrel is el volt látva. A molekulák vizes oldatban történő jellemzéséhez a jelazonosítást standard homonukleáris 2D Bruker impulzus szekvenciák segítségével végeztük. ROESY és TOCSY spektrumokat vettünk fel, ahol a ROESY spinlock-hoz 300 ms-es keverési időt alkalmaztunk. Az ismétlések száma 16 volt, és a roesyegpph impulzussor került alkalmazásra. A TOCSY méréseket a mlevesgpph sorozattal végeztük, 120 ms-es keverési idővel, az ismétlések száma pedig itt is 16 volt. A DOSY spektrumokat bipoláris gradiens segítségével (ledbpgp2s) mértük, szintén szelektált peptidekkel. Az elfázisolási/refázisozási gradiensimpulzus hossza ( $\delta$ ) 1,2 ms volt, a diffúziós késleltetés ( $\Delta$ ) pedig 150 ms. A gradiens erő négyzetesen változott 2%-ról 98%-ra, és a lépések száma 16 volt. A mérést 16 ismétléssel és belső kalibráció nélkül, 32k időtartományi ponttal végeztük el. A vizes oldatú mérésekhez 4 mM koncentrációt alkalmaztunk. A mérést követően a spektrumok feldolgozásánál megfelelő simítófüggvényt, zérus töltést, alapvonalkorrekciót alkalmaztunk. Az aggregátum moláris tömege az alábbi összefüggés alapján számoltuk:  $M_{\text{peptid}} = (DHOD/D_{\text{peptid}})^3 \times MHOD$ . Ezen felül 2D NOESY kísérleteket is végeztünk 10-25 mM DMSO-d<sub>6</sub> tartalmazó oldatban 25 °C-on, egy 600 ms-es NOESY keverési idővel, 1024 ponttal az  $f_2$  tartományban és 256 ponttal az  $f_1$  tartományban. Itt a jelazonosítást az MNova szoftverrel végeztük.

#### Infravörös spektroszkópia (ATR FTIR)

IR spektroszkópiát a peptidek szerkezetének, illetve a más molekulákkal történő kölcsönhatásainak (pl. lipidek) jobb megértéséhez alkalmaztuk. Az IR spektrumokat Varian

2000 Scimitar Fourier-transzformációs (FT-IR) spektrométerrel vettük fel. A spektrométer folyékony nitrogén hűtéssel ellátott higany-kadmium-tellurid detektorral és ún. „Golden Gate” egyreflexiós gyémánt ATR (csillapított teljes reflexiós) kiegészítővel volt felszerelve. Az ATR gyémánt felületére 3-5  $\mu\text{l}$  folyadékmintát cseppentettünk, amely levegőn való beszáritással száraz filmmé alakult. A spektrumot a száraz filmre vettük fel  $2\text{ cm}^{-1}$  névleges felbontással 64 felvétel átlagolásával. ATR korrekció után, a spektrumok kiértékelésére a GRAMS/32 (Galactic, USA) és az Origin szoftvercsomagot használtuk.

### Morfológia és részecskeméret

Transzmissziós elektron mikroszkópia (TEM), fagyasztva tört TEM (FF-TEM), krio-elektronmikroszkópia (cryo-EM)

*Transzmissziós elektron mikroszkópia* A vizsgált szerkezetekről és az azokból kialakult morfológiákról történő direkt képalkotáshoz transzmissziós electron mikroszkópia segítségével rögzítettünk képeket egy Morgagni 268D készüléket használva (FEI, The Netherlands). A készülékbe helyezhető mintatartókra a minták 2  $\mu\text{l}$ -es cseppek formájában kerültek. A mintatartó háló egy 200-as réz rács volt, melyen egy polivinil alkohol és formaldehid kopolimerizációjából készült ún. formvar kiegészítő film található. A főleges folyadék 20 másodperc után került eltávolításra. Kontrasztanyagként 5% foszfo-volfrámsavat alkalmaztunk, majd tíz perces kontaktidő után a főleges folyadék eltávolításra került és a mintát levegőn száradni hagytuk.

*Fagyasztva töréssel kapcsolt TEM* A hagyományos TEM méréseket kiegészítendő, a lipideket tartalmazó mintáknál fagyasztva töréshez kapcsolt TEM-et is alkalmaztunk (Freeze-fracture TEM, FF-TEM). A mintákból kis mennyiséget ( $\sim 1\text{ }\mu\text{l}$ ) raktunk egy arany mintatartóra, majd folyékony freonnal  $-194\text{ }^\circ\text{C}$ -on fagyasztottuk le. A mintákat  $-100\text{ }^\circ\text{C}$ -on törtük egy Balzers fagyasztatóval. A törött felületekről szén-platina replikák készültek.

*Krio-elektronmikroszkópia* A krio-EM a TEM szárított mintáival szemben egy oldatfázisból kifagyasztott mintát vizsgál, ezáltal közvetlenebb módon kapunk morfológia információt az oldatfázisban kialakult rendszerekről. A mintákat frissen plazmatisztított TEM-rácsokra vittük fel, majd folyékony etánban vitrifikáltuk egy Leica Microsystems készülékkel. A rácsokat ezután Autogrid kazettákba helyeztük. A mintákat Talos Arctica transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, a mikroszkópot 200 kV-on üzemeltetve. A mikroképeket Falcon3 közvetlen elektronérzékelő kamerával készítettük.

### Dinamikus fényszóródás mérés (DLS)

Az asszociátumok kialakulásának tényét, illetve a mintában levő nagyobb részecskék méreteloszlásának meghatározását DLS mérésekkel azonosítottuk, mely technika egyike a legalapvetőbb biofizikai eszközöknek magasabb szerveződéseket vizsgáló tanulmányokhoz. Az átlagos hidrodinamikai átmérőről ( $D_h$ ) és a minta polidiszperzitásáról információt egy W130i DLS mérésre dedikált készülék segítségével nyertünk (DLS, Avid Nano Ltd., High Wycombe, UK). A méréseket 20 °C-on (szobahőmérséklet), egy dióda lézer (660 nm) és egy fotodióda detektor segítségével végeztük. A mérések döntően alacsony térfogatigényű eldobható küvetákban történtek (1cm-es fénytáv, UVette, Eppendorf Austria GmbH). A minták általában több puffer jelenlétében kerültek vizsgálatra (pl. Tris-NaCl, HEPES-KCl, vagy PBS). Az időfüggő autokorrelációs függvények felvétele 10 másodperc alatt történt, 10 db ismétléssel, mely után az átlagos eloszlások kerültek megjelenítésre. A mérési adatok analizését a készülékhez tartozó iSize 3.0-s szoftvercsomaggal végeztük.

### Atomerő Mikroszkóp (AFM)

Az atomerő mikroszkópia kiváló technikai kialakult morfológiák méretének és alakjának megbízható tanulmányozásához. Az AFM-képeket egy Dimension 3100 atomerő-mikroszkóppal (AFM) rögzítettük, melyhez egy Nanoscope IIIa vezérlőt használtunk. A méréseket TappingModeTM rezgési módban végeztük. A nyers mérési fájlokat a Nanoscope szoftverrel dolgoztuk fel. A mérésekhez tiszta vízoldatból 1  $\mu$ l mintát cseppentettünk egy (100) szilícium lemezre, majd párolgással hagytuk azt kiszáradni.

## Számítógépes módszerek

### Kvantumkémiai számolások (QM)

A QM számolások kiemelt fontosságúak az olyan rendszerek szerkezeti tulajdonságainak megértésénél, melyekre jól definiált MD szimulációs paraméterek nem elérhetőek. Ebbe a tipikus csoportba tartoznak a dolgozatban szereplő nem természetes rendszerek, illetve azok ritkább, de elméletileg elérhető oligomer szerkezetei. A kvantumkémiai számolások a Gaussian 09, valamint Gaussian 13 szoftverekkel történtek. A különböző szubsztitúciós mintázatok esetén igyekeztünk azonos nomenklatúrát alkalmazni a kísérletek és a számolások tárgyalásánál. A triazol monomerek esetében a teljes konformációs tér lefedéséhez 27 ún. „vízválasztó régiót” azonosítottunk, majd ezekből kiindulva kerestük meg az energetikailag stabil konformereket. A kezdeti optimalizálást elsősorban a RHF/3-21G elméleti szinten végeztük el, majd ezeket B3LYP típusú sűrűségfüggő funkcionállal (Lee et al. 1988; Becke 1993),

valamint Chai és Head-Gordon által kifejlesztett  $\omega$ B97X-D funkcionállal finomítottuk a 6-311++G(2d,2p) bázist alkalmazva (Chai and Head-Gordon 2008). Utóbbi tartalmazza a diszperziós korrekciót és hosszú hatótávú elektron-korrekciókat. Ezen felül az M06-2X funkcionált is teszteltük (Zhao and Truhlar 2008). A hosszabb oligomerek másodlagos szerkezet preferenciájának becsléséhez, korábban meghatározott szerkezeteket alkalmaztunk és ezeket az  $\omega$ B97X-D/6-31G(d) elméleti szinten optimalizáltuk. A kritikus pontok validálásához, valamint az energiához tartozó nulla ponti és hőmérsékleti korrekciók, és harmonikus entrópia hozzájárulások kvantifikálásához normál mód analízist végeztünk el. Az oldószer hatását az IEFPCM (Integral Equation Formalism for Polarizable Continuum Model) oldószer modellel vettük figyelembe (Tomasi et al. 1999).

#### Dokkolások

A peptid–kismolekula komplexek jobb megértéséhez lehetséges kezdeti komplex struktúrákat molekuladokkolási szimulációkkal generáltuk. A ligandot a peptidhez (pl. CM15), mint receptorhoz két különböző megközelítéssel dokkoltuk az Autodock 3 (AD3) szoftver segítségével, rugalmas ligand- és merev receptor-dokkolást végezve (Morris et al. 1998). Az összes peptid konformerre összesen 1000 dokkolási futás történt, és a kapott kötődési energia alapján a legjobb 50 találatot választottuk ki. Emellett rugalmas receptor-dokkolást is futtattunk, egy ún. Dinamikus Molekuladokkolás (DMD) protokoll segítségével (Samsonov et al. 2014). A fent leírt szimulációkat minden konformer esetében 100-szor megismételtük, ami összesen 2100 komplexet eredményezett.

#### Molekuladinamikai számítások (MD)

A molekuladinamikai számítások alapvető betekintést adnak kisebb asszociátumok kezdeti kialakulásába és azok szerkezetének részleteibe, amire nagyon sokszor azért van szükség, mert ezek a rendszerek más atomi felbontást adó kísérleti módszerekkel nem, vagy csak nagyon nehezen tanulmányozhatóak. Az MD szimulációkat több szoftver segítségével végeztük. A CM15 rendszerek esetén a Gromacs2016.3 (Abraham et al. 2015), valamint AMBER 16 (“AMBER 16, University of California, San Francisco.) szoftvereket használtuk az ff14SB50 és GAFF erőterekkel, valamint a GROMACS szoftvert a CHARMM36m erőterrel (Huang and MacKerell 2013). A nem természetes  $\beta$ -peptidek esetében a CHARMM36m erőteret kibővítettük  $\beta$ -aminosavakhoz kifejlesztett torziós potenciál paramétereinkkel (Wacha et al. 2019).

Ezen szimulációk során TIP3P vizet használtunk és egy redukált méretű oktaéder (truncated octahedron) szimulációs dobozt. A peptid-kismolekula rendszerekben a magasabb rendeződési szintek tanulmányozásához vízben, DOPC (PC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)-, valamint DOPC/DOPG (PC/PG, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phosphorac-(1-glycerol)]) lipid kettős rétegek környezetében végeztünk szimulációkat. Emellett az 1:1 arányú peptid-kismolekula rendszerekre is végeztünk számolásokat. A kettős réteget tartalmazó szimulációkhoz először 128 lipiddel rendelkező modelleket generáltunk a CHARMM-GUI segítségével. A tiszta PC kettősréteg (DOPC) lipideket, a PC/PG pedig 80% DOPC lipidet és 20% (DOPG) lipidet tartalmazott. A rendszereket semlegesítettük, és 150 mM koncentrációban  $\text{Na}^+$  és  $\text{Cl}^-$  ionokat adtunk hozzá. Végül 500 ns szimulációkat futtattunk melyeken periodikus határfeltételeket alkalmaztunk minden irányban.

#### Parametrizálás

A suramin molekulát az ANTECHAMBER csomag (Wang et al. 2006) segítségével parametrizáltuk a GAFF erőterhez (Wang et al. 2004). A molekulát parametrizáltuk a GROMACS 2018.3-as szoftvercsomag CHARMM36m erőteréhez is. Ehhez a CgenFFv4.4.0 (Vanommeslaeghe et al. 2012; Vanommeslaeghe and MacKerell 2012) szoftvert használtuk, majd a CHARMM formátumról a charmm2gmx python szkript (MacKerell lab) segítségével konvertáltuk azt GROMACS formátumra.

#### Durva szemcsés szimulációk (CG-MD)

A CG-MD szimulációk a hagyományos minden atomot tartalmazó MD számításokon túl (all-atom MD), egyszerűsített molekulavázzal dolgoznak, viszont jóval nagyobb rendszerekbe, kiterjesztett időtartamon keresztül engednek betekintést. Éppen ezért a CG-MD makroszkópikus rendszerek kezdeti kialakulásának tanulmányozásához nagyon hasznos módszer. A suramin molekulát a MARTINI v3.072  $\beta$  verziójának erőterével paramétereztük. A CG-MD-t a GROMACS 2018.374 és a MARTINI v3.072 erőter segítségével futtattuk. A peptid-kismolekula komplexek kezdeti szerkezeteit a martinize Python szkript segítségével alakítottuk CG modellekké. A kezdeti szerkezeteket a GROMACS genconf paranccsal összefűztük és egy 36 db CM15-ből és 36 db suraminból álló rendszert hoztunk létre. A rendszert egy téglalap alakú doboz közepébe helyeztük, amit vízmolekulákkal és 150 mM koncentrációjú  $\text{Na}^+$  és  $\text{Cl}^-$  ionokkal töltöttük fel. A végső szimulációkat 10  $\mu\text{s}$ -on keresztül futtattuk. A lipideket tartalmazó szimulációkhoz az insane Python szkript segítségével

hoztunk létre kettősrétegeket. Mind a PC, mind a PC/PG rétegek esetében  $3195 \times 3195$  lipid volt jelen. A PC/PG lipidaránya 80% DOPC és 20% DOPG volt.

## Sejtes vizsgálatok

Sejtes és antibakteriális vizsgálatokat a választott peptideken kollaboráció keretében végeztük, Bősze Szilvia (ELTE), Horváti Katalin (HUN-REN TTK), Tóth Judit (HUN-REN TTK), illetve Xiaolin Lu (Dél-Nanjing Egyetem) laborjaiban.

### Humán sejtvonalas vizsgálatok

A citotoxikus hatást MonoMac6 (humán akut egy-sejtes leukémia) sejtvonalon mértük. Az eljárás előtt a sejteket szérumentes RPMI-közegben tenyésztettük, lapos aljú 96-os mintatálon (15 000 sejt, 100  $\mu$ l/mintatartó). A peptideket szérumentes közegben 200  $\mu$ M-es végső koncentrációban oldottuk fel, és kismolekulás komplexek esetén 1:1 illetve 1:2 molarányt alkalmaztunk (peptid:kismolekula). Minden esetben négy párhuzamos mérést végeztünk. A komponenseket 1,5 órán át inkubáltuk, majd a sejt vitalitást vizsgáltuk MTT teszt segítségével. A citotoxicitás átlagértékét szórással százalékosan a peptid koncentráció függvényében ábrázoltuk.

### Antimikrobiális aktivitásvizsgálatok

A peptidrendszerek antibakteriális hatásvizsgálatait *Escherichia coli* és *Streptococcus pneumoniae* baktériumokon végeztük el. A baktériumok liofilizátuma Bouillon mediumban került feloldásra, melyeket ezután 24 órán keresztül vér agar tálon tenyésztettük. A peptidek hatékonyságának ellenőrzéséhez a 0,5 McFarland szabvány 50-szeres hígítással lett elkészítve, majd 100  $\mu$ l baktérium oldatot tettünk egy 96-os U-alakú mintatartóba. Sejtmédiumként LB (Lysogeny broth) illetve MH (Mueller Hinton Broth) közegeket használtunk. Az adatok rögzítése 24 óra inkubálás után történt. Minden mintát minimum három párhuzamossal mértünk, ezek átlagai kerültek ábrázolásra, szórással.

### Fluoreszcens mikroszkópia

A DHVAR4 rendszerek esetében a tartrazin (TZ) és a peptid hatását különböző sejtes rendszerekre fluoerszcens mikroszkóppal is vizsgáltuk. Ehhez HeLa sejteken 5, 10 és 25  $\mu$ M-os fluoreszcensen jelölt peptidmintákat (Cf-DHVAR4) és vele 1:1 arányban kevert TZ-t használtunk. A felvételeket szobahőmérsékleten készítettük egy Leica TCS SP8

mikroszkópon egy 40 x PLAN APO objektív segítségével. Az apoptózis vizsgálatokhoz Alexa647 festéssel konjugált annexin V-öt (ThermoFisher Scientific) használtunk a forgalmazó leírásának megfelelően. A vizualizációhoz a LAS X 3.3.1 szoftvert használtuk. A Cf-DHVAR4-hez és Alexa647-hez rendre a 488 nm és 633 nm gerjesztési hullámhosszt alkalmaztuk, rendre az 500-550 nm-es és 650-800 nm-es detektálási ablakkal.

## Eredmények és diszkusszió

---

### Természetes peptidek indukált másodlagos szerkezete

Magasabb szervezések kialakulásához kapcsolt konformációváltozás – elvi megfontolások

Ebben a fejezetben mutatom be azon eredményeket, melyek antimikrobiális peptidek és szerves molekulák komplexképzése során indukált szerkezeti elemeket, a peptid-kismolekula komplexek képződését és a nagyobb méretű asszociátumok kialakulását részletezik biofizikai szemszögből. A tárgyalás módja nem időrendi, hanem inkább molekuláris szintek tematikáját követi. Ezen belül az atomi szinttől indulva a makromolekuláris szintig az elméleti és kísérleti vizsgálatok egymást kiegészítve kerülnek tárgyalásra a két komponensű rendszerek esetén bekövetkező folyamatok átláthatóbbá tétele szempontjából.

A bevezetésben taglaltak alapján az antimikrobiális peptidek esetében a peptidgerinc oldatban rendezetlen szerkezete a rövid aminosavszekvencia, a váltakozó –döntően- azonos töltésű vagy hidrofób oldalláncok, valamint a gerincben található peptidkötések nagy arányban szolvatált állapotának kombinált hatására eredeztethető vissza. A megfigyelt konformációváltozással járó lipid membránokra történő asszociáció során a lipid kettősréteg egyfajta dinamikus platformként szolgál az azt megközelítő peptid részére, mely elősegíti, hogy a hidrofób oldalláncok orientálódjanak a lipidek kevésbé szolvatált acillánc régiója felé, miközben a többségében kationos töltésű oldalláncok a lipid kettősréteg fejcsoport régiójában létesítenek elektrosztatikus kölcsönhatást az ellentétes töltésű, vagy részlegesen negatívan polározott funkciós csoportokkal. Az így kialakuló monomer peptidek egyik legnagyobb csoportja helikális térszerkezetet vesz fel, ám számos redőzött, vagy kanyar alakú aktív konformációval rendelkező gazdavédő peptid is leírásra került (Haney et al. 2017). Természetesen meg kell említenünk, hogy egyes peptidszekvenciák oldatfázisban cisztein oldalláncok között létesült diszulfid hidakkal stabilizálhatják szerkezetüket, melyek esetében a biomembránra történő adszorpció során a fentebb leírt térfogatváltozás mértéke jóval mérsékeltebb. Következő lépésként, - kísérő, asszociációra hajlamos molekulák hiányában- a funkció hatásának kifejtéséhez gyakran egy olyan magasabb asszociátumba rendeződés kapcsolódik, mely alapot adott a peptidek számos antimikrobiális mechanizmusát leíró modellek kifejlesztéséhez (1. ábra). Noha a fenti hatásmechanizmusok esetén számos megfejtendő részlet maradt, az elmúlt évtizedek alatt azonban egyre mélyebb betekintést

nyerhettünk ezekbe, és jelentős tudásbázis segíti ma már az elméleti és kísérleti új tanulmányokat.

A magasabb rendeződés jelenléte a közelmúltban kimutatásra került AMP-k és ellentétes töltésű makromolekulák között is, RNS, DNS, heparin és egyéb biológiai polimerek spontán alkotnak asszociátumokat (Hale and Hancock 2007; Ganguly et al. 2009; Zsila et al. 2018). Ezekkel szemben az AMP-szerves kismolekula típusú asszociátumok csoportja szinte felderítetlen, nem értett terület, melynek sem szerkezeti aspektusait, sem potenciális biológiai jelentőségét nem értjük. Csoportunkból Zsila Ferenc és mtsai. munkássága nyomán néhány kezdeti eredmény mutatta azt, hogy az AMP-k funkcionális jelentőséggel bíró kismolekulákkal képesek rendezett, vagy részlegesen rendezett szupramolekuláris rendszereket képezni, melyeknek akár funkcionális jelentősége is lehet (Zsila et al. 2017; 2018). Ezek jobb megértéséhez a kezdeti irányindító eredmények alapján szisztematikusan is tanulmányoztuk két- és három komponensű rendszerek viselkedését, ezzel jobb betekintést remélve az AMP-k szerveződési tulajdonságaiba.

Két komponensű rendszerek elméleti vizsgálata (D1)

*„Gergő (telefon, Gdansk): -Te figyelj én ezt akkor is a JACS-be akarom küldeni, azt akarom lássák, hogy micsoda szutykot publikáltak ebből!*

*T. (telefon, napsütéses Magyar tudósok körútja): - Ööö, Gergő, de hát olvastad Peter Stang választát nem? Hiába van igazad, ott policy, hogy korábbi munkát kritizáló tanulmányt nem adnak ki, ez ellen ő se tud mit tenni...*

*-Nem érdekel, akkor is küldjük be oda!*

*- Három hónap Lengyelországból kiesik két cikked, ez szuper eredmény, inkább erre koncentrálj. Akartad, hogy írjak neki, hát írtam. Ezután oda küldeni nem hülyeség szerinted?*

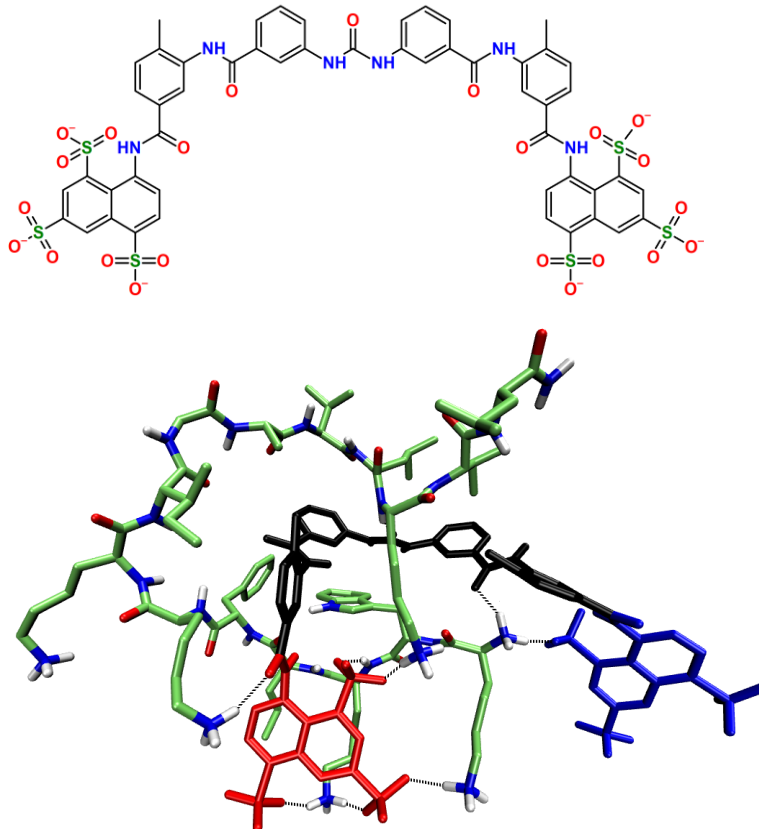
*- Én akkor is azt akarom, hogy lássák, oda küldjük!*

*- Hadd beszéljek Sergey-el is, és lássuk ő mit mond, ok?*

*-.....(csönd)....(csönd)...ok”*

Kezdeti tanulmányaink során térszerkezetváltozást tapasztaltunk az AMP-k esetén olyan molekularendszerekkel is, melyek az antimikrobiális peptidokhoz képest ellentétes, általában többszörös negatív töltéssel rendelkeznek és amelyek az említett biomakromolekulákhoz képest jóval kisebb tömegűek. A jelenség több szempontból is érdekes. 1. Természetes biomolekulák esetében egy ilyen komplexképződés hatással lehet mind a gazdavédő peptid, mind pedig a kis biomolekula funkciójára. 2. Az ilyen jellegű kölcsönhatások lokálisan megjelenhetnek olyan mesterséges molekulákkal is, melyeket pl. étkezés, vagy terápia közben viszünk be szervezetünkbe, ezzel potenciálisan időlegesen módosítva immunrendszerünk teljesítőképességét. 3. Amennyiben a vizsgált peptidok

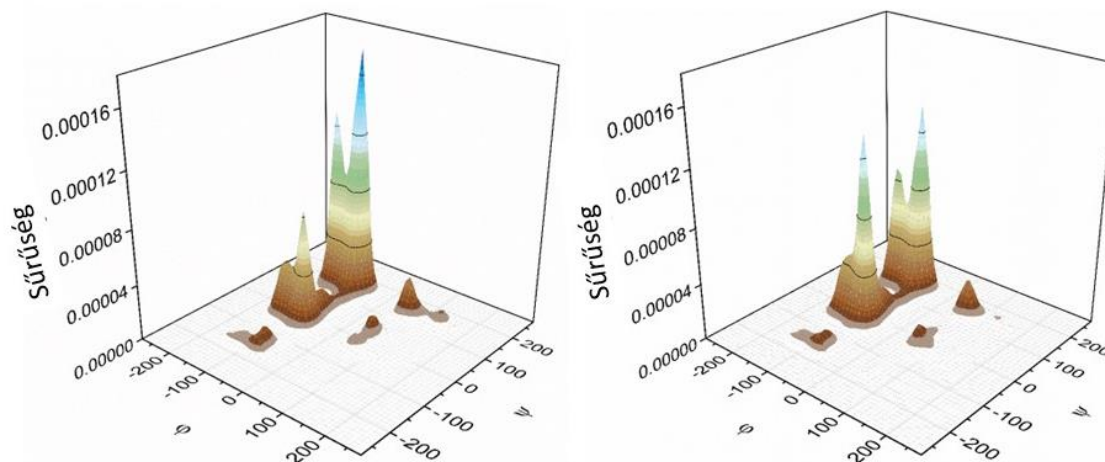
aktivitása eképpen modulálható, úgy lehetőség van arra is, hogy a peptidok pl. gyógyszermolekulák célpontjai lehessenek, valamint természetesen kialakult szabályozó mechanizmusokra is rámutathatnak, melyek segítenek a molekuláris biológiai folyamatok egymásra hatásának megértésében. Ezek olyan új lehetőségeket nyithatnak, mely során a természetes gazdavédő peptidekre -pl. a fehérjékhez hasonlóan- gyógyszercélpontként is tekinthetünk a jövőben.



8. ábra. (fent) A suramin szerkezeti képlete. (lent) A CM15 antimikrobiális peptid és suramin 1:1 komplexének MD szimulációból származó pillanatképe

A térszerkezet-változás egyik kulcseleme a tapasztalt kölcsönhatásnak. Ugyanakkor ennek molekuláris szintű megvalósulása nem tisztázott. A jelen rendszerek erős asszociációs, illetve aggregációs hajlandósága miatt a klasszikus módszerek, úgy, mint NMR spektroszkópia, vagy röntgenkristallográfiai vizsgálatok nem bizonyultak alkalmasnak a folyamatok molekuláris szintű jobb megértéséhez. Éppen ezért a morfológiai és másodlagos szerkezetet vizsgáló biofizikai módszerek mellett szimulációs technikák alkalmazása is indokolt. Erre példarendszernek a szintetikus CM15 peptid és a poliszulfonált, 6 negatív töltéssel rendelkező suramin tűnt ideálisnak, mivel a kezdeti kísérleti eredmények alapján ez a rendszer kezdetben szignifikáns szerkezetváltozást eredményezett. A két komponens alacsony arányú keverése

először feltehetően peptid-szerves molekula komplexek kialakulását eredményezte, melyet nem követett azonnal makromolekuláris félig rendezett asszociátumok kialakulása. Ennek megfelelően a peptid konformációs terét jártuk be MD szimulációk segítségével (8. ábra). A szimulációt több erőtermodell segítségével futtattuk végig, mely így több térszerkezeti egységet (klasztert) eredményezett. Ezeket az előfordulás sorrendjében rangsoroltuk.



9. ábra. CM15 torziós szögeinek normált eloszlása suramin nélkül (bal oldal) és suraminnal komplexálva (jobb oldal). A helikális konformációra jellemző torziós szögek populáltsága megnövekedik a suramin hatására.

A konvencionális MD szimulációk alapján azt láttuk, hogy a suramin inkább stabilizálja a peptidok helikális térszerkezetét, semmint indukálja annak kialakulását. Éppen ezért metadinamikai szimulációkat futtattunk amelyekben  $\alpha$ -helikális térszerkezetből indítottunk számolásokat és azt vizsgáltuk, hogy a normális (unbiased) szimuláció mennyire megfelelően járta be a konformációs teret. Azt tapasztaltuk, hogy a CM15 suramin jelenlétében sokkal jobban megtartotta a kezdeti helikális szerkezetet, mint a suramin nélküli futtatások során (1. táblázat és 9. ábra, 10. ábra). Összességében az első legnépesebb klaszterek a CM15-öt önmagában tartalmazó szimulációknak 39,5%-t, viszont a CM15-suramin rendszert tartalmazóknak a 85,5%-t teszik ki. A DSSP (Define Secondary Structure of Proteins, fehérjék másodlagos szerkezetét meghatározó algoritmus, (Kabsch and Sander 1983) számolások alapján a suramin hatására ezen helikális klaszter populáltsága közel háromszorosára emelkedett a suramin jelenléte miatt. Így különböző szimulációs módszerek mind egyazonos eredményt adtak, amely nagymértékben erősíti az elméleti számolások által adott kvalitatív megfigyelés megbízhatóságát.

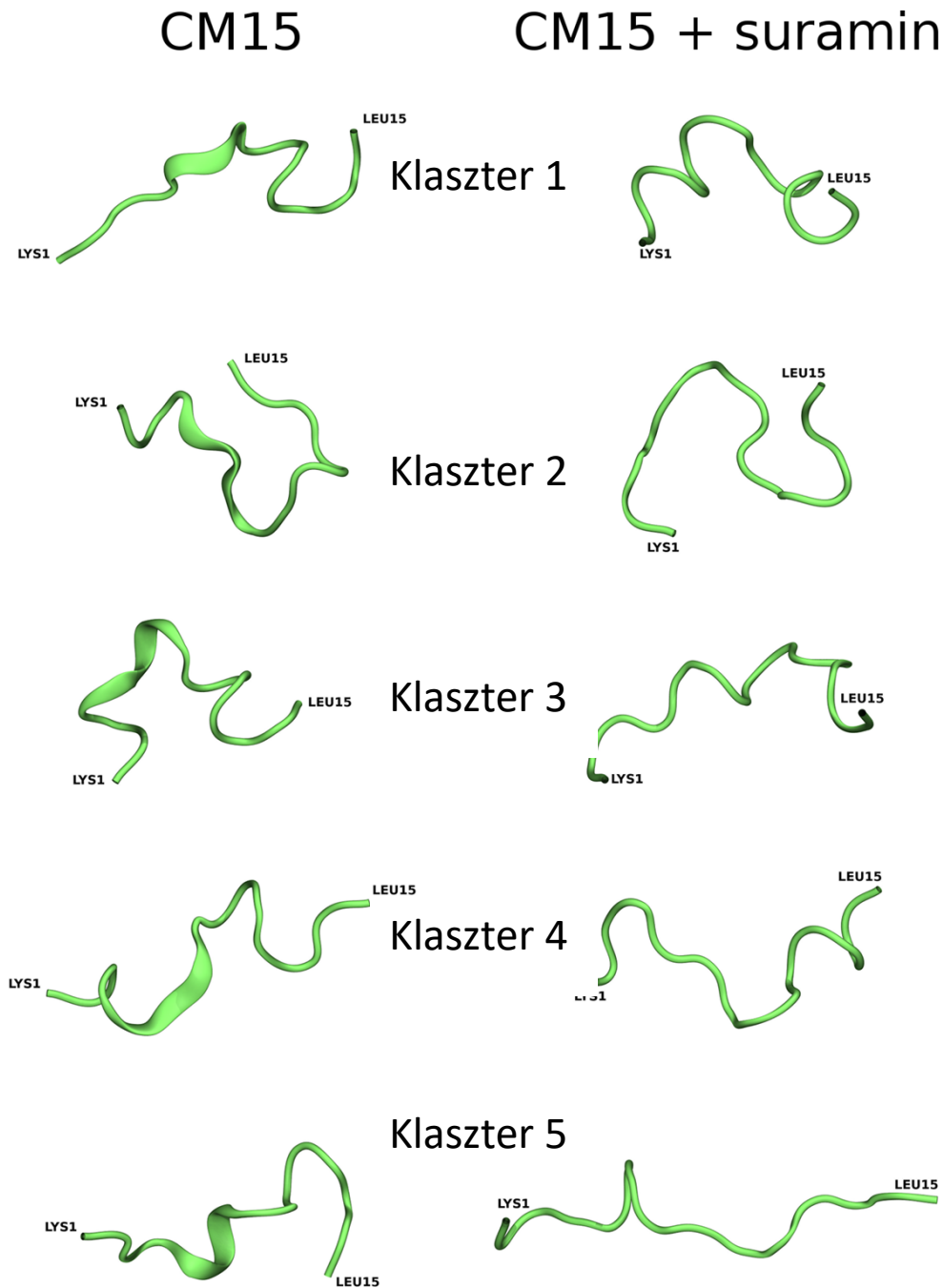
Rövid összefoglalásként elmondható, hogy a kísérletileg korábban megfigyelt jelenséget sikeresen tudtuk végigkísérni elméleti szimulációkkal. A szabadentalpia számítások segítségével meghatározható volt, hogy a relative erős kötődés a suramin és a példa AMP-

ként használt CM15 molekula között jelentős entrópia tagot is tartalmaz. A kötődési szabadentalpiákat különböző szerkezetekre meghatározva arra jutottunk, hogy nem egy egyedi komplex képződik, hanem inkább egy olyan sokaság melyben hasonló kölcsönhatások alakulnak ki. Érdekes módon a suramin központi, semleges része járul a leginkább hozzá a kötődéshez, mely rámutat -a töltések mellett- a van der Waals szabadentalpia hozzájárulások jelentőségére a komplexképződésben.

A torziós szögek vizsgálata alapján kijelenthető, hogy a suramin jelenléte nagy mértékben növelte a helikális konformáció százalékos előfordulását. Ezt alátámasztották a DSSP számolások, valamint a metadinamikai szimulációk is. Ez teljes mértékben megegyezik a korábban elvégzett kísérleti megfigyelésekkel. Ugyanakkor, az itt elért atomi szintű felbontás arra is rávilágított, hogy a suramin jelenléte nem a feltekeredést segíti elő, hanem inkább stabilizálja az AMP véletlenszerű konformációváltozásaiban a helikális szerkezetet. Ez kísérleti biofizikai módszerekkel nem látható, ugyanakkor nagyon fontos megfigyelés, hiszen így érthető, hogy bizonyos esetekben a suramin azért nem ér el „hélix indukáló hatást”, mert az adott szekvencia véletlenszerű dinamikája során nem vesz fel ilyen szerkezetet. Tekintettel arra, hogy a kiválasztott példa számos aspektusa általánosítható AMP – kismolekula komplexek kialakulása során, utóbbi megfigyelésnek jelentős szerepe lehet jövőbeni racionális gyógyszer- és komplextervezés során.

**1. táblázat. A CM15 metadinamikai szimulációja során kapott szerkezetek klaszteranalízise. A szimulációkat mind suramin nélkül, mind suramin jelenlétében is futtattuk. (A értékekhez vezető számolások részleteihez lásd (Kohut et al. 2019)).**

Rendszer	Klaszter rang	Klaszter populáció / %	Helicitás / %	Teljes populáció részaránya / %	Teljes helicitás / %
CM15	1	13,1	33,3	39,5	9,7
CM15	2	7,9	0,0		
CM15	3	7,3	73,3		
CM15	4	6,6	0,4		
CM15	5	4,6	0,2		
CM15 + suramin	1	46,3	73,3	85,5	36,7
CM15 + suramin	2	19,0	0,0		
CM15 + suramin	3	8,8	0,0		
CM15 + suramin	4	8,3	33,3		
CM15 + suramin	5	3,1	0,0		



10. ábra. Metadinamikai szimulációk klaszter analízise során kapott CM15 reprezentatív szerkezetek suramin nélkül (bal) és suramin jelenlétében (jobb).

A lizofoszfátidsav hatása peptidszekvenciák térszerkezetére (D2)

„Tünde: -Nem tudom, ahhoz, hogy lássak valamit fentebb kell mennem a koncentrációval. Ha meg fentebb megyek akkor az LPA micellát képez. Hogy mérjem ezt ki, az egész olyan izéé, olyan nyomi...

T: Jó lesz ez, szerintem kezd összeállni.

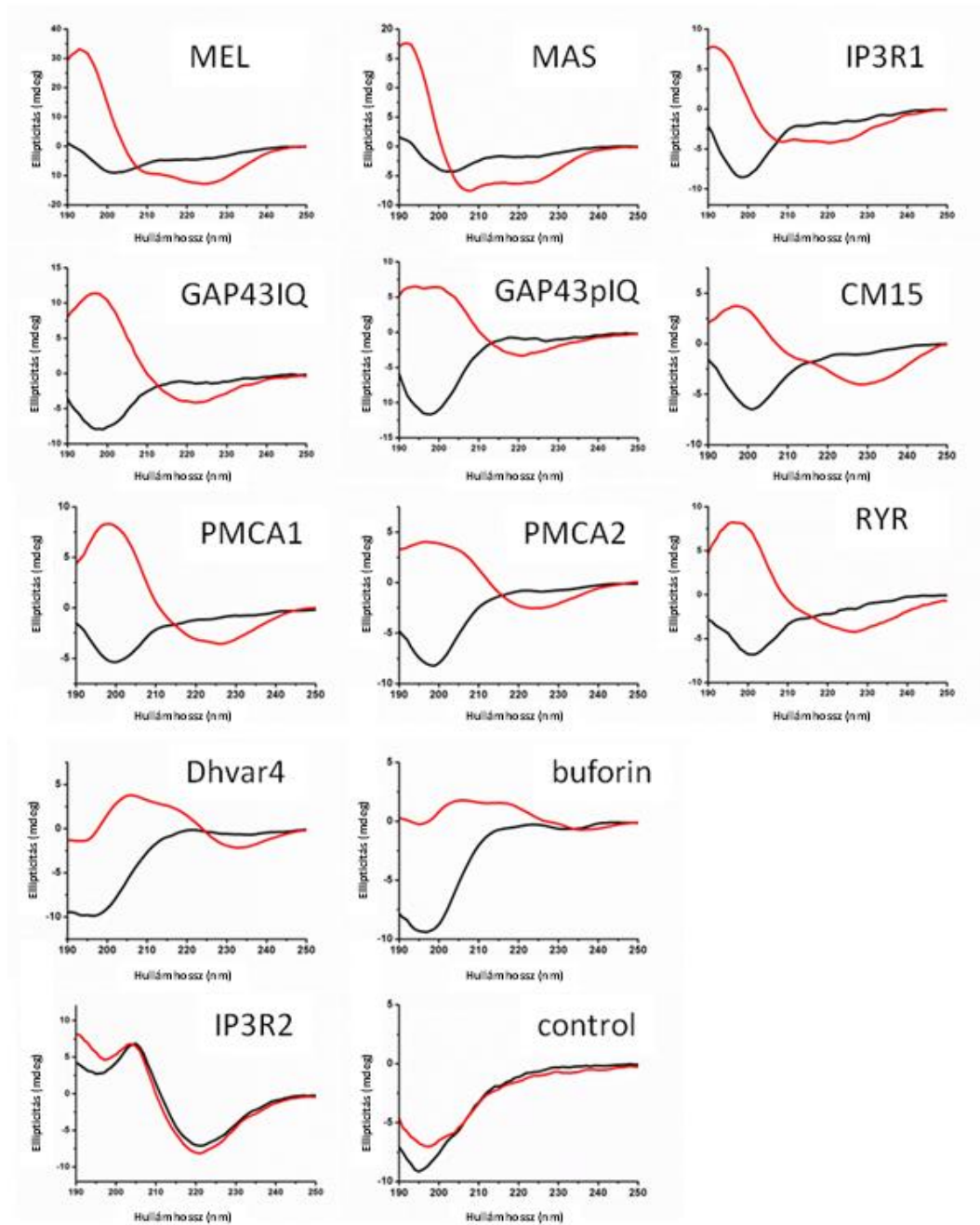
- Arrghh, HÜLYÉT KAPOK AMIKOR EZT MONDOD! (BUMM! #ajto)”

A fenti elméleti számolások mellett a két komponensű peptidek és egyéb molekulák között létrejövő kölcsönhatásokhoz kapcsolt térszerkezet- és morfológiai megfigyeléseket kísérletes módszerekkel is részletesen analizáltuk. Korábban említésre került, hogy liposzómák, bicellák és egyéb lipid kettősrétegek jelenlétében ismert, hogy különböző antimikrobiális és membránaktív peptidek jelentős szerkezetváltozáson mehetnek keresztül miközben a kettősréteg fejcsoport régiójához csatlakoznak. Ebben a munkában számos AMP-t és szekvenciálisan igen hasonló fehérjerészletet vizsgáltunk, melyekre jellemző a bevezetőben leírt szerkezetváltozás. Ennek indukálásához azonban nem lipid kettősréteggel rendelkező komplexebb lipid szerkezetet vettünk alapul, hanem egy lipid jelzőmolekulát, a lizofoszfátidsavat (LPA). Ezen vizsgálatok jelentősége abból fakad, hogy amennyiben jelentős kölcsönhatásokat találunk, úgy olyan endogén molekulák képesek szabályozni AMP-k és rendezetlen fehérjerégiók szerkezetét, melyek potenciálisan együtt lehetnek jelen *in vivo* körülmények között a vizsgált peptidrészletekkel, mely biokémiai folyamatok szabályozásának megértéséhez fontos betekintést adhat (2. táblázat).

**2. táblázat. A tanulmányban alkalmazott peptidek. AMP, CBD, és MBD rövidítésekkel az antimikrobiális (és gazdavédő) peptideket, a calmodulin kötő motívumokat, valamint a membrán kötő doméneket jelöltem. A kationos aminosavak piros, az anionosak kék, a triptofánok pedig zöld színnel vannak feltüntetve.**

Peptid	Típus	Szekvencia	Aminosav szám
MEL, melittin	AMP	GIGAVLKVLTITGLPALISWIKRKRQQ-amid	26
MAS, mastoparan	AMP	INLKALAALAKKIL-amid	14
CM15	AMP	Ac-KWKLFFKKIGAVLKVL-amid	15
Dhvar4	AMP	KRLFFKLLFSLRKY	14
BUF, buforin	AMP	AGRGKQGGKVRAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNV	39
GAP43(p)IQ	CBD	AATKIQA (p) SFRGHITRKKLKGEKKDD	25
IP3R1, IP3R1 peptide1	CBD	KSHNIVQKTALNWRLSARNAAR	22
IP3R2, IP3R1 peptide2	CBD	ENRKLGLTVIQYGNVIQLLHLKS	23
RYS	CBD	KSKKAVWHKLLSKQRRRAVACFRMTPLYN	30

PMCA1	CBD	LRRGQILWFRGLNRIQTQIRVVKAFRSS	28
PMCA2	MBD	KKAVKVPKKEKSVLQGLTRLAVQI	25
Kontroll peptid	-	EEHIYDEVAADP	12



11. ábra. A peptidek távoli UV-CD spektrumai LPA hiányában (fekete) és jelenlétében (piros). Az indukált másodlagos szerkezet főként helikális (felső sor), vagy  $\beta$ -redőzött réteg (középső sorok).

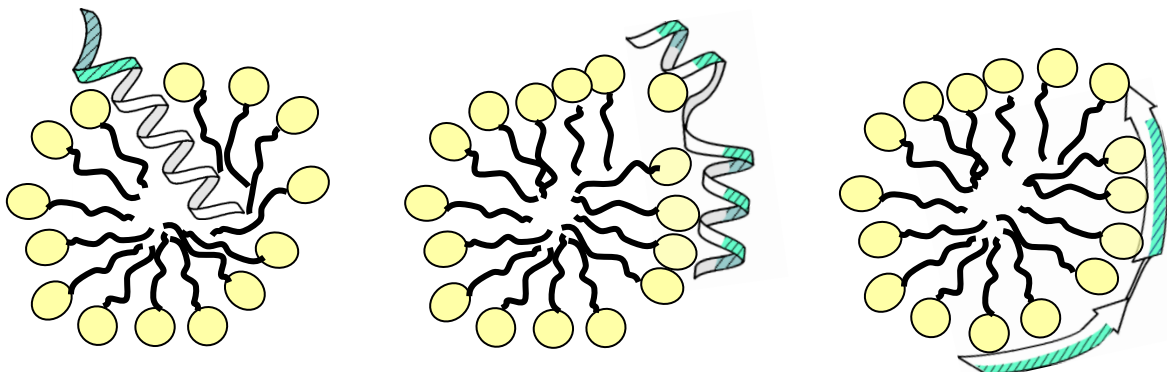
Az indukált konformációváltozást elsősorban polarizált fényspektroszkópiával követtük. A CD spektroszkópiás eredmények egyértelműen megmutatták, hogy egy olyan endogén lipid eredetű jelmolekula, mint az LPA is képes másodlagos szerkezet felvételét indukálni számos

rendezetlen AMP és hasonló fehérjerészlet esetén. Tekintettel, hogy mind az AMP-k, mind a példaként vizsgált kalmodulin-kötő fehérje régiók esetében az aktív szerkezeti alak a helikális, a vizsgálat eredménye azt mutatja, hogy az LPA képes ezek aktív alakját előmozdítani pl. a rovarméreg melittin és mastoparan, valamint a kalmodulin kötő IPR3P1 motívum esetében (11. ábra). Ezzel szemben, olyan markáns szerkezetváltozásokat is azonosítottunk, melyeknél megnövekedett a  $\beta$ -redőzött réteg kialakulása ami a vizsgált peptidek esetén nem jellemző, ritka másodlagos szerkezet. Hogy a jelenség mögött álló okokat részben megérthessük, megvizsgáltuk a peptidek molekuláris szintű szerkezeti különbségeit egy leegyszerűsített vizualizációs módszerrel is, fókuszálva arra, hogy a hidrofób, valamint hidrofil szekvenciareszek mely felvett másodlagos szerkezet ( $\alpha$ -hélix, vagy  $\beta$ -redő) esetén mutatnak szisztematikus egy helyre történő rendeződést. Összevetve a megfigyeléseket a kísérleti eredményekkel a következő három sematikus kölcsönhatás típust azonosítottuk (12. ábra).

1. Korábbi tanulmányok egyértelműen kimutatták, hogy hosszabb, apoláris szekvenciák gyakran helikális szerkezetet vesznek fel, majd a membrán kettősrétegébe ágyazódnak (Nordén et al. 2010). Ekkor a hélix másodlagos szerkezet sikeresen lefedi a peptidkötések poláros részeit az apoláris oldalláncokkal, így a lipid kettősréteg inkább utóbbiakkal érintkezik. A megfigyeléseink alapján a melittin és mastoparan valószínűleg hasonló módon lépett kölcsönhatásba az LPA-val, mely a vizsgált koncentrációban már micellás alakban volt jelen. Ezen peptidek esetén egy hosszú apoláris régió figyelhető meg, a töltéssel rendelkező aminosavak nagyrészt a szekvencia terminális részein találhatóak, mely régió így a lipid környezetből kilógva a poláros vizes közegben szolvatálódhat. Erre a kötődési módra utal a melittin Trp fluoreszcenciáját követő mérésünk is, mely során a tapasztalt markáns fluoreszcencia változás alapján feltételeztem, hogy a Trp és környezete mélyen az LPA micellák belsejébe kerül (Juhász et al. 2018).
2. Ezzel szemben pl. a mastoparan, vagy az IP3R1 típusú peptideknél azt figyelhettük meg, hogy helikális szerkezetnél az apoláris régiók nagyrészt a hélix egyik oldalára, míg a poláros oldalláncok a hélix másik oldalára kerülnek. Ezek esetében éppen ezért egy olyan kapcsolat valószínűsíthető az LPA micellákkal, melyek során a peptid helikális alakban „ráfekszik” a micella felszínére az apoláris felével, miközben a töltéssel rendelkező oldalláncok a vizes fázis felé mutatnak. Ez az elrendezés jellemző a lipid kettősrétegeken „szőnyeg” modellek esetében is (Brogden 2005).
3. A CD és IR vizsgálatok azonban számos vizsgált peptid esetében mutattak nyújtott  $\beta$ -redőzött, vagy  $\beta$ -szálra jellemző spektrumokat is. Ezekben a peptidekben általában keverednek a poláros és apoláris régiók, és feltehető, hogy a nyújtott konformáció

elősegítheti a poláris és apoláris csoportok jobb szétválasztását a peptidlánc egyik illetve másik oldalára.

Az LPA-val történő kölcsönhatások a vizsgált peptidek esetén olyan másodlagos szerkezeteket eredményeztek, melyeket korábban az adott szekvenciára még nem azonosítottak. A vizsgálatok rámutattak arra, hogy az LPA milyen mechanizmusok mentén formálja a peptidek konformációját, valamint oligomerizációját, természetesen mindezeket egy koncentráció-függés mentén. Hozzá kell tennünk, hogy ez a lipid kismolekula önmagában is képes micellákba rendeződni, mellyel így egyszerre kaptunk egy monomeres, és egy egyszerűsített kettősréteget képező kölcsönható párt. Ezek alapján a következő specifikus megfigyeléseket tettük: (1) a Trp aminosavak átrendeződik az LPA lipid klaszterek belsejébe, (2) a két kötődő partner között többszörös kapcsolódási pont alakul ki molekuláris szinten, (3) az LPA-kból álló asszociátumokhoz több peptid is kapcsolódik, az erre vonatkozó kötődési affinitás az alacsony mikromoláris tartományban van, (4) az LPA jelentős szelektivitással bír a többi hasonló szerkezetű detergenshez és lipidhez képest.

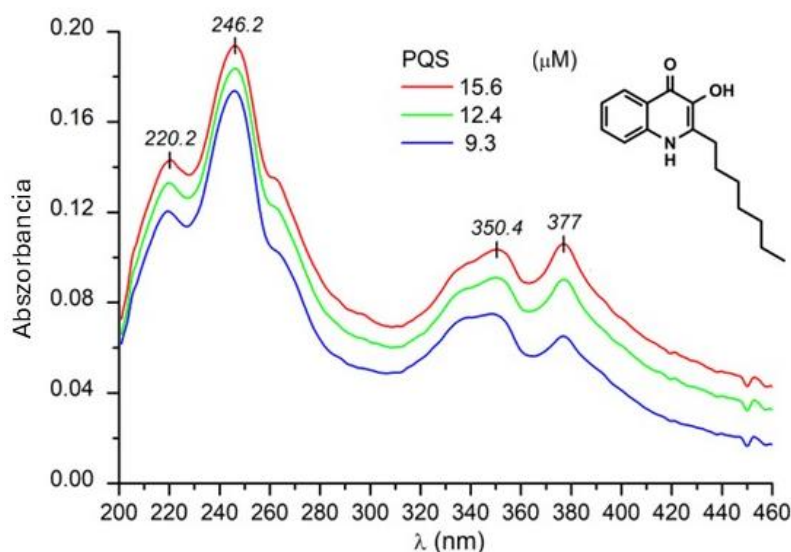


12. ábra A vizsgált peptidek LPA micellákkal történő lehetséges kölcsönhatásait leíró három sematikus modell. Micellába ágyazott helikális peptid (bal), Helikális peptid a micella felületén (közép) és egy kinyújtott  $\beta$ -szál szinten a felszínen (jobb).

Ezen kísérletek során sikerült olyan konformációváltozásokat megfigyelni, melyek az adott AMP-k esetében atipikusak, eddig nem tapasztaltak. Az eredmények így nem csak az LPA és peptid kölcsönhatások természetébe adtak betekintést, hanem általánosságban is értékelhetőek és alátámasztják, hogy az AMP-k esetén számos aktív mechanizmus még ismeretlen, és azok valószínűsíthetően túlmutatnak a közvetlen membránon kifejtett toxikus hatáson, vagy egy sejten belüli célfehérjéhez való kötődésen. A konkrét LPA-val kapott eredmények kimutatják az LPA moduláló hatását a peptidek szerkezetére nézve. Ezek alapján várható, hogy az AMP-k *in vivo* körülmények között egzotikusabb konformációk felvételével képesek eredeti funkciójukhoz képest komplementer feladatot is ellátni az immunrendszer működésében.

## Quorum érzékelő molekulák szupramolekuláris asszociátumai (D3)

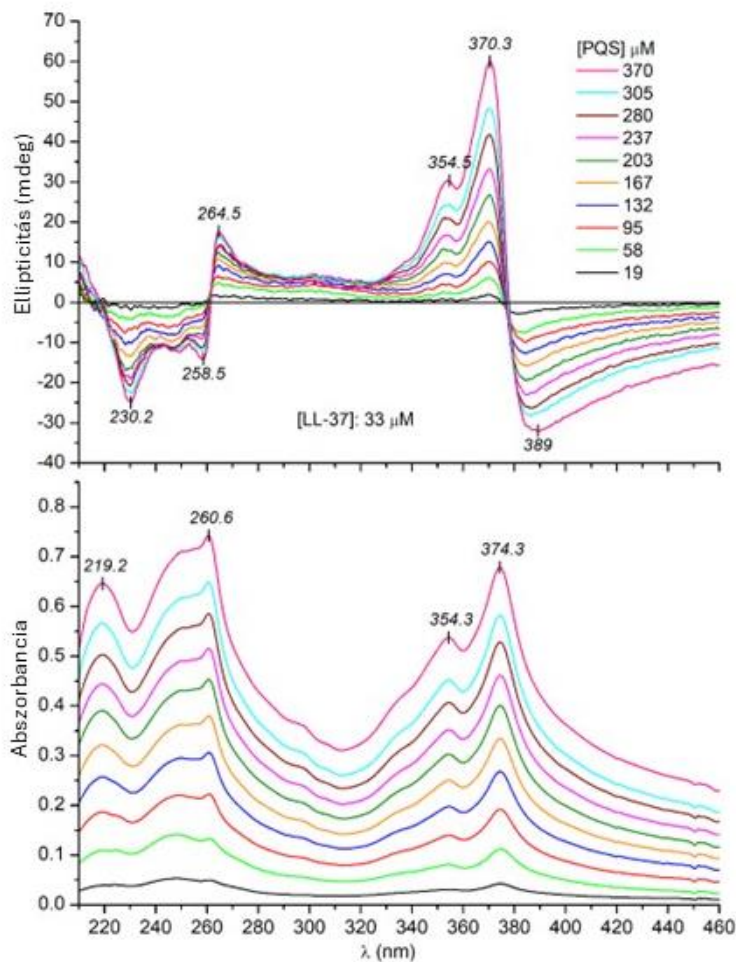
A gazdavédő peptidek széleskörű biológiai funkcióit egyre több tanulmány támasztja alá (Hancock et al. 2016). Ezek közül érdemes megemlíteni a sebgyógyulásban, angiogenezisben, valamint általános immunszabályozásban feltárt szerepeiket. Az előző fejezetben molekuláris alapon mutattuk be, hogy humán jelzőmolekulák képesek asszociátumokat képezni AMP-kkel, mely során egyedi szerkezetek jelennek meg a peptidek esetében. Ennek folyamányaként vizsgáltuk, hogy képesek-e más hasonló funkciót betöltő molekulákkal is kölcsönhatni. Ezek közül az egyik legérdekesebb a bakteriális biofilmekben levő baktériumok közötti kommunikációért felelős, az ún. quorum sensing (quorum érzékelő, QS) molekulák csoportja. Tekintettel arra, hogy a baktériumok esetén a biofilm képzés az egyik leghatékonyabb módja a kismolekulás antibiotikumok végzetes hatásainak kivédésére, ezért ennek lebontása különösen fontos terápiás cél. Ehhez kapcsolódóan érdemes megjegyezni, hogy számos gazdavédő peptid esetében (pl. LL-37) feljegyezték, hogy antibiofilm hatása erősebb, mint közvetlen baktériumölő mechanizmusa (Grassi et al. 2017; Koo et al. 2017). Ennek molekuláris alapja ugyanakkor egyáltalán nem értett. Éppen ezért vizsgáltuk, hogy QS molekulákkal képesek lehetnek-e az AMP-k a humán endogén vegyületekhez hasonló módon komplexképződéssel járó kölcsönhatásra lépni. Ehhez kiválasztottuk az előbb említett reprezentatív LL-37 gazdavédő peptidet, valamint a *Pseudomonas aureginosa* kinolon jelző molekuláját (Pseudomonas quinolone signal, PQS) (13. ábra) és arra voltunk kíváncsiak, hogy a kettő a fentiekhez hasonló konformációváltással jelzi-e komplexképződési



13. ábra. PQS abszorbancia spektruma PBS-ben. Jobb felül a PQS molekula szerkezeti képlete.

hajlandóságukat. A kezdeti CD és abszorpciós spektrumok felvétele után látható volt, hogy a PQS és LL-37 interakciójakor egyedi koasszociációk alakulnak ki, melyek a CD spektrumokban indukált CD jeleket produkálnak (14. ábra).

A megfigyelhető indukált CD jelek pozíciói megegyeznek az egyébként akirális PQS molekula főbb abszorpciós csúcaival. Ezeknek megjelenését a királis peptiddel alkotott – nagy valószínűséggel rendezett – asszociátumok keletkezése indukálhatja. A PQS által elindított aggregációs jelenséget követték dinamikus fényszóródás mérésekkel is (DLS), melyek igazolták, hogy az LL-37 önmagában nem alkot asszociátumot, ám a PQS-el való titrálás jelentősen megnövekedett hidrodinamikai átmérővel rendelkező részecskéket eredményez.



14. ábra. Az LL-37 peptid PQS-sel történő titrálása során kapott indukált CD -, és elnyelési spektrum

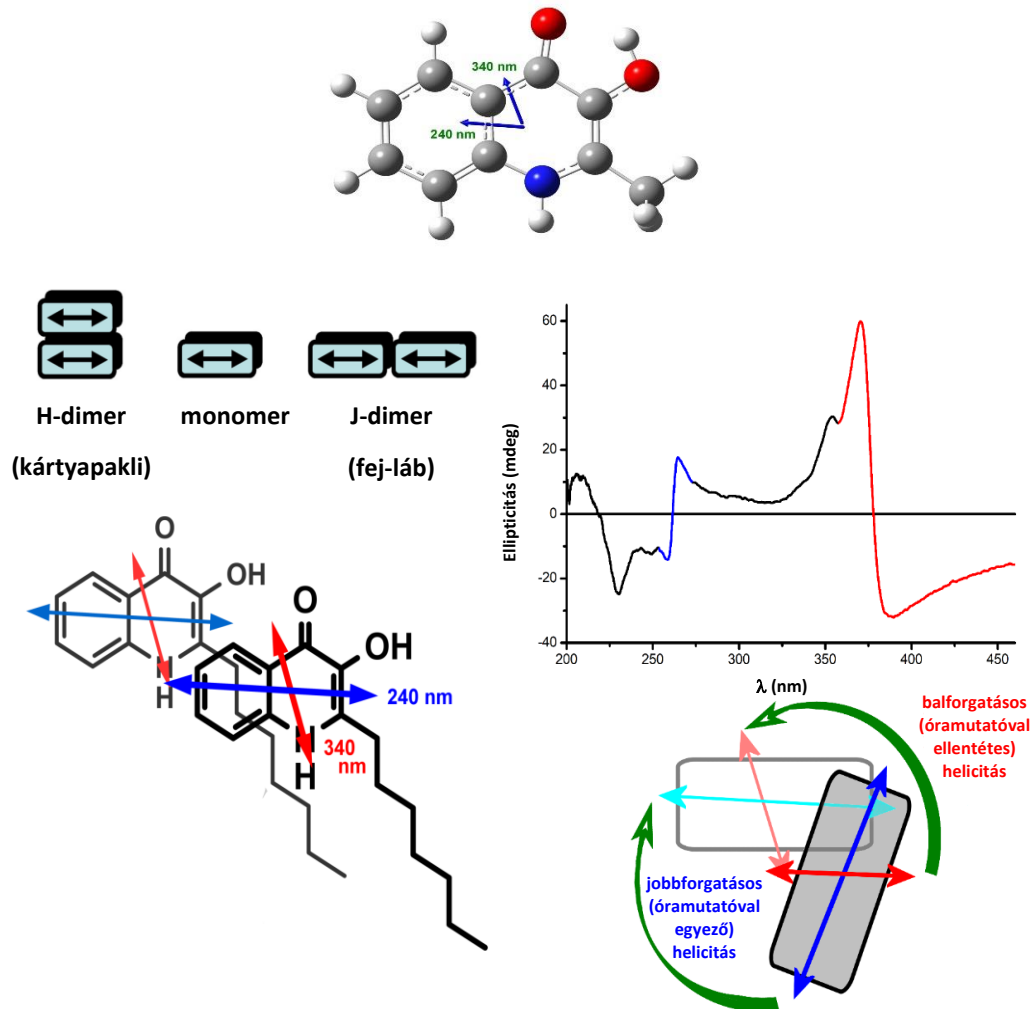
A CD spektrumban megjelenő két csúcs 260 nm-nél és 375 nm-nél a titrálás során egyértelműen a folyamatosan növelt PQS koncentráció eredményeként jelenik meg. A 375

nm-nél lévő sáv két intenzív Cotton-hatás (Cotton effect, CE) miatt ellentétes előjelű CD jellé válik ketté. Az alacsonyabb hullámhosszú 260 nm-es sávnál hasonló, de ellentétes irányú kettéválást látunk. A CE-k hatása egyértelműen nőtt titrálás során, ami mentén azonban nem jelentkezik telítődés, még 15-szörös PQS többlet esetén sem. Ezek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a peptid láncai nagy valószínűséggel molekuláris templátként szolgálnak a PQS molekulák számára, melyek így királis szupramolekuláris asszociátumokat építenek fel. Érdeemes megjegyeznünk, hogy egymáshoz párhuzamosan rendezett PQS molekulák esetén nem érhető el királis asszociátum. Ezek alapján valószínű, hogy egy J-típusú aggregátumot képez a rendszer, melyben egy azonos irányú - nagyjából azonos méretű- csavarodás jelenik meg az egyes molekulák között (15. ábra). Ezt valamilyen módon az LL-37-el közös kapcsolat határozza meg, mely aztán jó eséllyel terjed végig a felépülés során a teljes makromolekulán. Az exciton kiralitási szabályok alapján - melyek rámutatnak, hogy a jelek felhasadása és előjelváltásuk sorrendje a kölcsönható átmeneti momentumokból ered - következtethetünk arra, hogy a hosszú tengely mentén milyen irányú a csavarodás menete (Boiadjev and Lightner 2005; Pescitelli et al. 2014). Az alacsonyabb hullámhosszú negatívát követő magasabb hullámhosszú pozitív sáv óramutató irányával megegyező csavarodást jelez, míg ennek ellenkezője óramutatóval ellentétes irányt ad.

Tekintettel a domináns sávban tapasztalt irányra, feltételezhető, hogy a PQS - LL-37 koasszociátumon belül egy óramutató járásával ellentétes irány valósul meg. Az ezzel ellentétes irányt javasló 260 nm-es sáv felhasadása esetében valószínűsíthető, hogy bizonyos elektronikus átmeneti dipólusmomentumok a hidroxikinolon gyűrűn belül pont ellentétesen kapcsolódnak a kialakult morfológián belül (15. ábra).

Összeségében elmondható, hogy a biofilmekben jelen lévő QS kommunikáció egy nagyon fontos jelzőrendszer, mely szabályozza a viruláns faktorokat, a biofilm diszperzióját és ezzel terjedését, valamint elősegíti az antibiotikum rezisztencia terjedéséhez szükséges kulcs molekulák sejtek közötti transzportját. Éppen ezért potens stratégiai irány a biofilmek gyengítése felé ezen kommunikációs rendszer akadályozása, ellehetetlenítése. Hasonlóan a sziderofór molekulák semlegesítésében szerepet játszó LL-37 – sziderofór komplexek kialakulásához (Zsila and Beke-Somfai 2020), az itt megfigyelt kölcsönhatások betekintést, részleges magyarázatot adhatnak a gazdavidő peptidek antibiofilm hatásának molekuláris alapjaira. Sajnos biofilmekben belül ezek megfigyelése még nem megoldott, így a jelenség teljes megértése még távolabbi cél. Az *in vitro* megfigyelt királis szupramolekuláris rendszerek további vizsgálata, jobb megértése mikroszkópiás mérésekkel természetesen szintén szükséges, ám már jelen formában is fontos támpontokkal láthatja el az *in vivo*

folyamatok kezdeti megértését. Az eredmények és a PQS-sel történő komplexképzés ezeken felül rámutat a gazdavédő peptidek diverz potenciális védekezési módjaira mikrobiális fertőzések esetén.



15. ábra. A PQS főbb elektronikus átmeneti dipólusmomentumainak elméleti úton számolt irányultsága, és az indukált CD jelek alapján a molekulák morfológián belüli relatív csavart elrendeződésének lehetséges értelmezése.

#### AMP-k magasabb szintű szerveződése endogén vegyületekkel (D4)

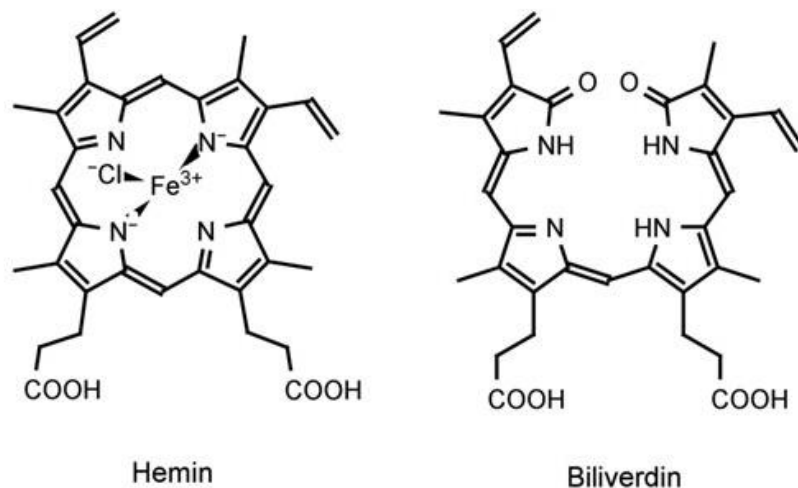
A korábbi vizsgálatok nyomán kezdeti kísérleteket végeztünk arra vonatkozóan is, hogy vajon endogén vegyületek befolyásolhatják-e az antimikrobiális gazdavédő peptidek asszociációját. Kezdeti kísérleteink azt mutatták, hogy bizonyos szintetikus peptidek kölcsönhatnak hemin metabolitokkal (16. ábra). Ezek alapján kiválasztottunk 9 AMP-t – köztük több természetes gazdavédő peptidet-, hogy megvizsgáljuk a hemin- illetve biliverdinnel esetleges kölcsönhatásukat, a kialakuló magasabb rendű asszociációkat, valamint ezen kölcsönhatások

potenciális biológiai jelentőségét (3. táblázat). Referenciaként a melittin nevű méhméreg peptidet választottuk.

3. táblázat. Heminnel és Biliverdinnel történő kölcsönhatás és asszociáció vizsgálatához használt antimikrobiális tulajdonságú peptidek

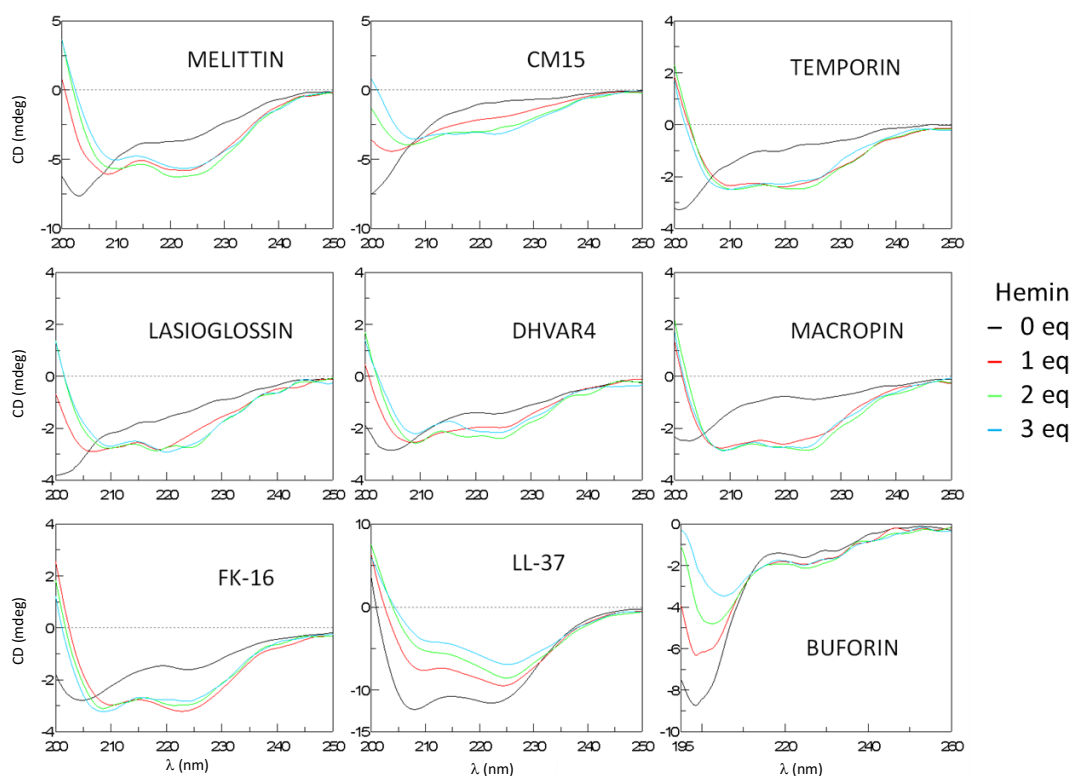
Peptid	Eredete	Szekvencia	Aminosavsám	Töltés
<b>Melittin</b>	Rovar méreg	GIGAVLKVLTTGLPALISWI KRKRQQ	26	+6
<b>CM15</b>	Szintetikus hybrid	KWKLFFKIGAVLKVL	15	+6
<b>LL-37</b>	Humán	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRI VQRIKDFLRNLVPRTES	37	+7
<b>FK-16</b>	LL-37-ből származtatott	FKRIVQRIKDFLRNLV	16	+5
<b>Buforin I</b>	Béka gyomor, hiszton- származék, Human gyomorfoladék <sup>a</sup>	AGRKGQGGKVRKAKTRS SRAGLQFPVGRVHRLLRKG NY <sup>a</sup>	39	+13
<b>Dhvar4</b>	Humán nyál hisztatinból származtatott, szintetikus	KRLFKLLFSLRKY	14	+7
<b>Macropin 1</b>	Rovar méreg	GFGMALKLLK KVL	13	+4
<b>Lasioglossin III</b>	Rovar méreg	VNWKVVGKI IKVAK	15	+3
<b>Temporin-La</b>	Béka bőr	LLRHVVKILE KYL	13	+6

A kölcsönhatáshoz kapcsolódó potenciális konformációváltozást CD spektroszkópia segítségével vizsgáltuk. Önállóan pufferben a vizsgált peptidek szinte mindegyike egy ~200 nm-nél negatív csúccsal jellemzett, rendezetlen szerkezetnek megfelelő CD spektrumot mutat. A peptidekhez 0-3 ekvivalensnek megfelelő hemint -, mely a természetben megtalálható hem leggyakrabban alkalmazott kísérleti megfelelője-, illetve biliverdint adtunk (17. ábra).



16. ábra. Hemin és biliverdin szerkezete

A CD spektrumokon látható jelentős változások minden esetben arra engednek következtetni, hogy a hemin jelenléte már 1:1 arányban is jelentős helikális feltekerődéssel jár a legtöbb vizsgált peptid esetében. Kivételek a már eleve részleges hélix konformációt mutató LL-37, valamint a továbbra is rendezetlen buforin, azonban a jelentős változások a CD spektrumban ezeknél is kölcsönhatásra mutatnak, mely valószínűleg asszociátumok megjelenését is előrevetíti. Az LL-37 esetében az enyhe intenzitáscsökkenés mellett figyelemre méltó az  $\alpha$ -hélixre jellemző 208 nm-nél és 222 nm-nél lévő két negatív csúcs arányának változása, amely során a 222 nm-es csúcs enyhe vörösetolódást is mutat. Ez azt jelzi, hogy bár a helikális szerkezet megtartott, az  $n-\pi^*$  átmenethez kapcsolódó csúcsonál a hélix peptidkötéseinek

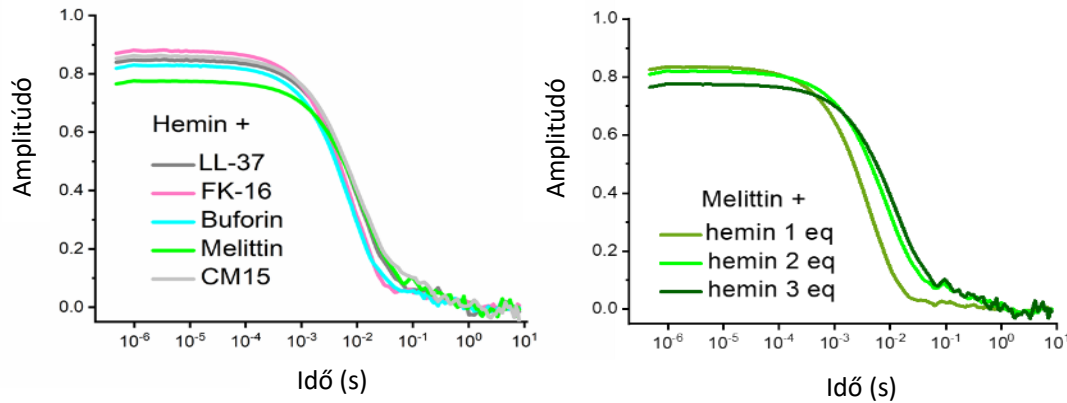


17. ábra. Kiválasztott peptidok CD spektrumainak változása heminnel történő titrálás során. A kialakult másodlagos szerkezet a legtöbb peptidnél helikális.

karbonilcsoportjai egy hidrofóbbabb környezetbe kerülhetnek, ahol a  $\pi^*$  energiaszintje valamelyest stabilizálódhat. Ezt a jelenséget nem látjuk az LL-37 16-os szekvenciárészletéből álló FK-16-nál, ami azt mutatja, hogy az FK-16-hoz képest az LL-37 esetlegesen magasabb szintű asszociátumokat képezhet.

Ezen nagyobb méretű molekula-szerveződések megjelenésének igazolására több választott mintán DLS méréseket végeztünk, melyek kimutatták, hogy az oldatban a kezdeti komplexképzésen felül mikrométeres nagyságú asszociátumok is kialakulnak. A morfológiák kialakulását nagy valószínűséggel az 1:1, 1:2, illetve 1:3 peptid:hemin arány esetén a

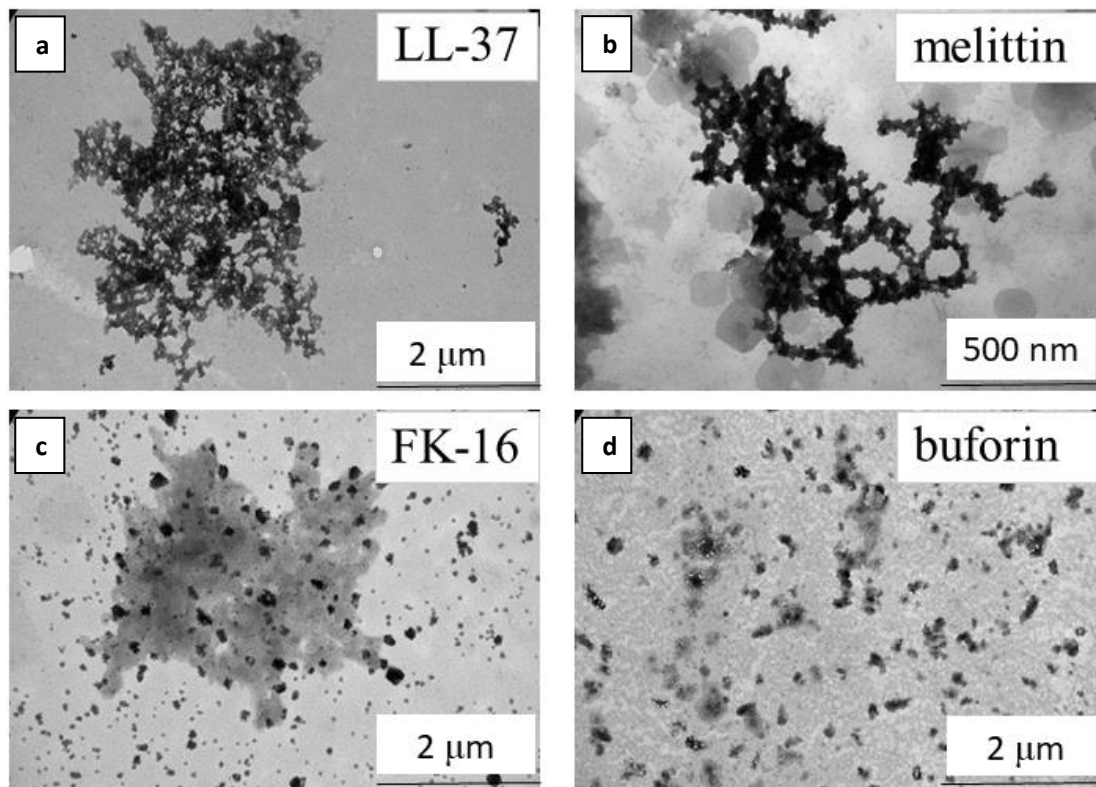
részleges, vagy teljes töltéskioltás, valamint a hidrofób szekvencia régiók és a porfirinvázon található aromás és a peptidok aminosav oldalláncain fellelhető telítetlen aciklusos molekularészletek egymáshoz tapadásával elinduló komplexképzés spontán módon indukálja. (18. ábra).



18. ábra. Peptid-hemin komplexek asszociátumainak kialakulása. DLS korrelációs függvények, amelyek peptid-hemint asszociátumokat mutatnak a nanométer— mikrométer tartományokban.

Ezek a nagyobb morfológiák megfigyelhetőek a kiválasztott peptidekről készült TEM ábrákon is, ám itt érdemes észrevenni az egyes morfológiák mérete és kiterjedtsége között tapasztalt jelentős különbségeket (19. ábra). Míg a vizsgált négy antimikrobiális peptidből az LL-37, valamint a melittin kiterjedt, több mikrométeres morfológiákat mutat, addig az FK-16 és buforin jóval kisebb, néhány száz nanométeres, önálló asszociátumokat alkot.

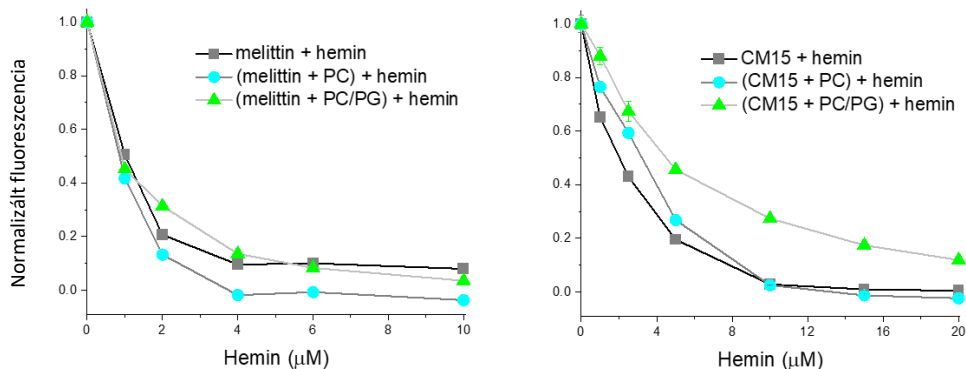
Itt érdemes megemlíteni, hogy a 37 aminosavas LL-37 egy az egyben tartalmazza a 16-aminosavas FK-16 szekvenciát, ennek ellenére lényeges különbség mutatkozik a TEM ábrákon a magasabb szerveződés kiterjedtségében. A CD görbék alapján nagy valószínűséggel az LL-37 esetében látható nagyrészt helikális peptid alkot egy rendezettebb asszociátumot, mely aztán helikális szerkezetű oligomer-asszociátumokból rendeződik a TEM ábrákon látható kiterjedt hálózattá. Ezzel szemben az FK-16 heminnel történő asszociációja megreked a különálló, alacsonyabb rendezettségű, gömbszerű morfológiáknál. A közelmúltban krio-EM technikával sikerült kimutatni az LL-37 17-29-es régiójának helikális szupramolekuláris szerkezeteit (Engelberg and Landau 2020). Ebben a tanulmányban a 13-aminosavas szegmens pont az FK-16 szekvenciatartományból származik, mely mutatja, hogy mind az FK-16, mind az LL-37 már önállóan is nagy affinitást mutat önrendeződésre, ami azonban a vizsgált endogén molekulákkal tovább alakítható.



19. ábra. (a-d) AMP-hemin asszociátumok TEM ábrái, melyek eltérő méreteloszlást és komplexitást mutatnak

A mikrométerű asszociátumok kialakulásának fontos aspektusa, hogy azok hogyan változtathatják meg a peptidok membránaktivitását. Ezt vizsgáltuk különböző modell liposzómák esetében is. A melittin rövidebb szekvencia-részletét tartalmazó szintetikus CM15-ről ismert, hogy szelektíven kötődik a negatív töltésű membránokhoz, és hemolitikus aktivitása alacsonyabb (Tosteson et al. 1985; Sato and Feix 2008). Ennek megfelelően a CM15 esetében a PC liposzómához csak részleges kötődést figyeltünk meg. Amennyiben a rendszerhez hemint adunk, úgy a CD görbe alapján megnövekedett helicitást láttunk. Hasonlóan, az LL-37 esetében sem volt megfigyelhető nagyobb konformációváltozás a liposzómák esetében. Ugyanakkor a hemin jelenléte hasonló – asszociátumokra jellemző – helikális CD görbét eredményezett, mind egyedül, mind liposzómák jelenlétében. Érdekes módon az FK-16 esetén nagyobb konformációváltozás megy végbe heminnel való titrálás esetén (17. ábra). Az elért görbe jellege fennmarad liposzómák esetében is, ami arra enged következtetni, hogy ismét a hemin kötődés a dominánsabb. Noha a buforin spektruma a többi vizsgált peptidhez képest jelentősen különböző konformációt feltételez, az viszont hasonló, hogy a liposzómák jelenléte itt sem okoz relatív változást a hemin-kötött állapotban.

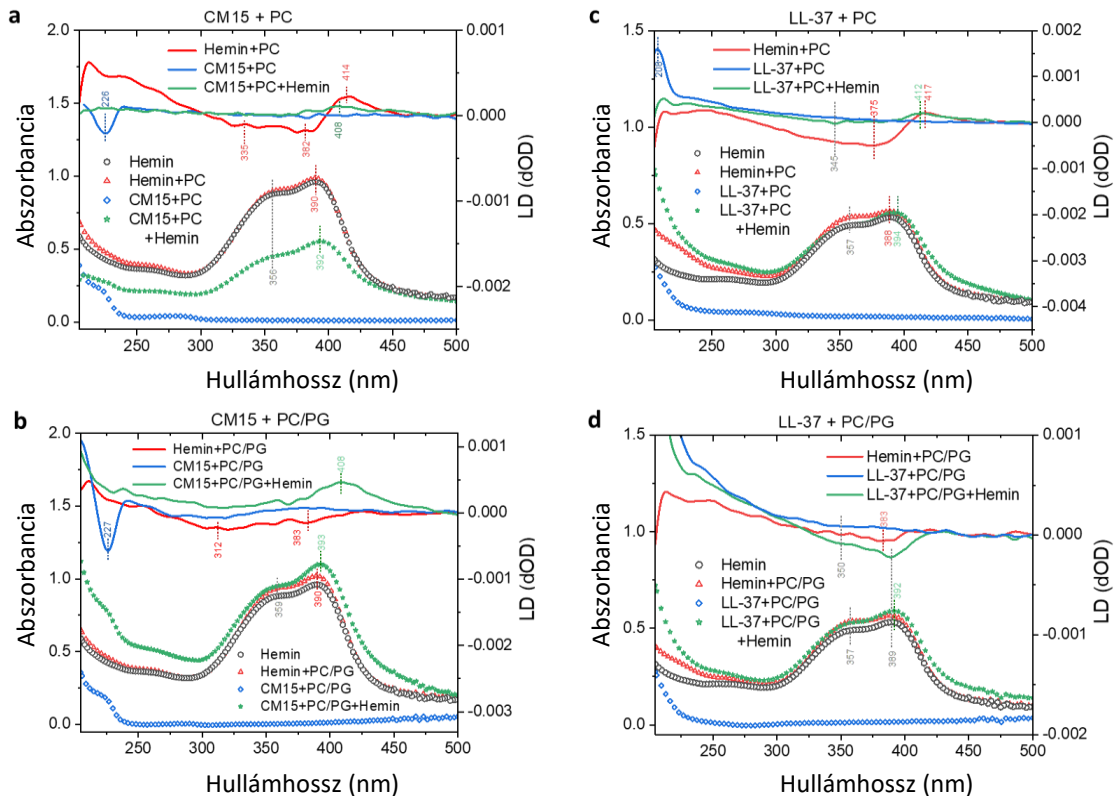
Általánosságban elmondható, hogy a nagy méretű asszociátumok kialakulása a heminek és liposzómák jelenlétében a spektrális csúcsok intenzitáscsökkenését eredményezi mindegyik vizsgált peptid esetében. Nagyon hasonló eredményeket kaptunk a triptofán tartalmú peptideknél mért fluoreszcencia kioltását vizsgáló mérésekkel is (20. ábra). Ezek arra engednek következtetni, hogy a heminnel történő kölcsönhatás preferált a membránkötődéssel szemben. Ugyanakkor, a fluoreszcens mérések azt is kimutatták, hogy a három komponensű rendszerek esetén az asszociátumok mind a három komponenst tartalmazzák: AMP-ket, hemin molekulákat és liposzómákat is.



20. ábra. Fluoreszcencia titrálás kiválasztott triptofánt tartalmazó peptidekkel hemin jelenlétében, hiányában és modellmembránokkal.

A fentiek megmutatták, hogy a heminre adott válaszok peptidenként eltérőek lehetnek. Ennek további vizsgálatára LD méréseket végeztünk (21. ábra). Ezek kimutatták, hogy a hemin molekulák már magukban is képesek szerkezetiileg rendezett módon adszorbeálódni és orientálódni a lipid kettősrétegeken. Erre a 300-400 nm régióban látható széles negatív sáv, valamint az élesebb 410-420 nm-nél levő pozitív csúcs utal, melyek az abszorbancia spektrum alapján a hem csoport Soret sávjából eredeztethetőek. Korábbiak alapján ebben a kötődési módusban a hem két ortogonálisan elhelyezkedő átmeneti dipólus momentumából egyik a membrán normáljával, a másik pedig a membrán felszínével áll preferentáltan párhuzamosan. Ezt az orientációt semleges lipidekből álló kettősréteg esetében mind a két vizsgált peptid jelentősen csökkenti, mely alapján a három komponensű rendszerben a hemin orientációja véletlenszerűvé válik. Ezzel szemben a negatív felületű PC/PG liposzómák esetén a hemin kezdetben alacsony jelintenzitású spektrumot ad, mely jelentősen megnövekedik a peptidek jelenlétékor. Ezek alapján sejthető, hogy egy membrán-kötött peptid-hemin asszociáció jelenik meg, melyben a hemin pozíciója párhuzamos a felszínnel a CM-15 esetében, viszont erre inkább merőleges, ha LL-37-el vizsgáljuk.

A három komponensű rendszerek esetén elmondható, hogy a peptidok helikális szerkezete csak részlegesen marad meg a hemin jelenlétében, és akkor is csak a PC/PG liposzómák esetén. Ezt a megfigyelést támasztják alá azon Trp fluoreszcencia mérések, melyek szintén azt mutatták, hogy a három komponensű rendszerben a peptidok lazább kapcsolatban maradtak a membránnal.



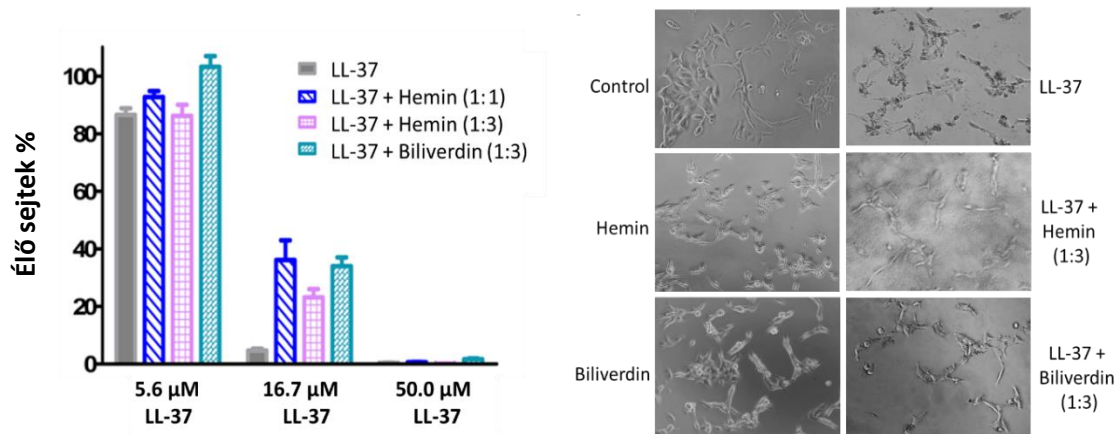
21. ábra. Orientált kötődés heminhez, modellmembránokon peptidok jelenlétében és hiányában. Az LD és abszorpciós spektrumokat PBS-ben, 50% szacharózzal kiegészítve vettük fel. A három komponensű rendszerekben a hemin hozzáadása peptidokkal előinkubált liposzómás mintákhoz történt.

A fentiek biológiai relevanciáját sejtes esszékkal teszteltük. Ezek egyértelműen kimutatták, hogy az LL-37 citotoxikus hatását jelentősen csökkenti a hemin jelenléte. (22. ábra). Ezzel feltehetőleg az immunrendszer képes lehet modulálni a túlexpresszált AMP-k saját sejtekre káros hatását, ezáltal kontrollálni a külső fertőzésekre történő immunválaszt (Kumar and Bandyopadhyay 2005; Schmitt et al. 1993).

Ugyanakkor érdemes figyelembe venni a hemin toxikus biológiai hatását is, hiszen az eredmények a peptidok hem-kötő tulajdonságát, valamint azokkal történő magasabb asszociációk jelenlétét általánosságban is mutatják. A megfigyelés, miszerint a membránokkal szemben pl. a hemin és metabolitjainak kötődése preferálnak tűnik a vizsgált AMP-k esetében, alapvetően átértelmezi a korábban a szélesebb kutatói közösségben rögzült

szemléletet, nevezetesen azt, hogy az AMP-k funkciója kimerül az ellenséges mikrobiális membrán roncsolásában.

Eredményeinkre is hivatkozva egy viszonylag friss tanulmány azonosított egy 24 aminosavas peptidet, mely az általunk vizsgáltakhoz képest 1000 szerez mértékben képes hemet kötni és azzal asszociátumokat képezni (Sankari et al. 2022). Idézett tanulmány szerzői az MIT-ről egy amerikai szabadalom keretében le is védették a hem rögzítő peptidek családját, ezek terápiás potenciálja miatt. Ezen példák jól mutatják, hogy a fenti kölcsönhatások *in vitro* vizsgálata közvetlenül stimulálja a biológiai kölcsönhatások megértését, és az eredmények az élővilág igen tágran értelmezett részein mutathatnak rá konkrét összefüggésekre, illetve ezen megfigyeléseknek közvetve terápiás és gazdasági relevanciája is lehet.



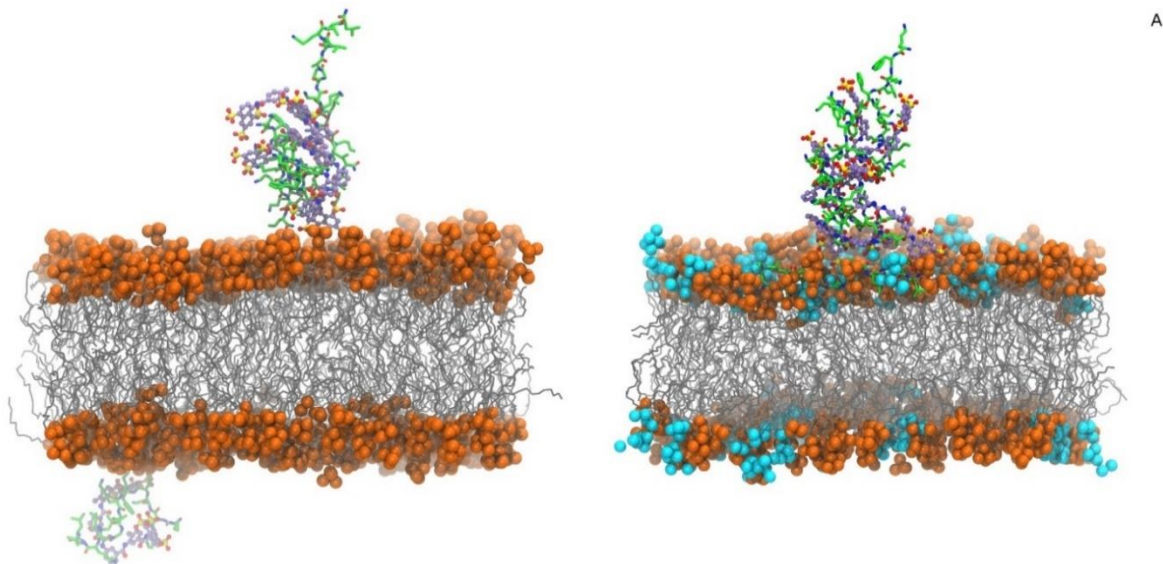
22. ábra. Citosztatikus és citotoxikus hatások EBC-1 sejteken nézve. A sejtvizsgálatokat LL-37 és hemin, illetve biliverdin jelenlétében és hiányában végeztük. (bal) Élő sejtek relatív aránya. (jobb) Fénymikroszkópos képek a sejtek 3 órás kezelése után. A megfigyelhető sötét foltok a sejtek körüli háttérben a peptid-hemin asszociációk kialakulását jelzi.

Három komponensű rendszerek kialakulásának szimulációs és kísérletes vizsgálata (D5, D6)

„T (TTK Varga Zoltán szobája): Khm. Ne vedd zaklatásnak, de kb. másfél éve várunk a TEM képekre, pláne a fagyasztva törésre, esetleg lehetne, hogy ne a Richteres minták kerüljenek előre, hanem a miénk?”

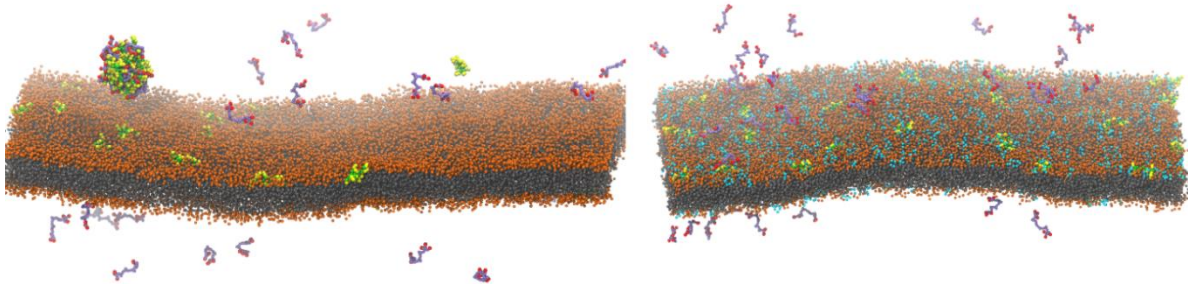
Z.V. (vörösödve): Nos, pontosan tudod, hogy ez a TEM olyan mint, egy 5008-as, állandóan csak javítgatjuk, mégse javul meg. A mintáid sorban állnak, ahogy mindenkié amikor megállapodtunk, hogy én viszem ezt a szerencsétlent. A Richteres viszont már határidős, azok előre kerülnek. Szóval zaklatásnak veszem, te pedig vársz ahogy mindenki!”

A korábbi példák bemutatták, hogy a peptidok bonyolultabb asszociátumainak tanulmányozása érdekes mind gyógyszerfejlesztési szempontból, mind az *in vivo* hatásuk jobb megértése végett. Ezen felül, az előző fejezet végén, már látható volt, hogy membránaktív peptidok kismolekulákkal történő vizes (két komponensű) asszociátumait szükséges egy harmadik komponens, a lipid kettősréteg jelenlétében is vizsgálni, hogy az *in vivo* környezethez közelebbi modellen jobb betekintést nyerjünk az asszociátumok viselkedésébe. A kialakuló asszociátumok membránaktivitásának jobb megértéséhez kísérleti és elméleti szempontból vizsgáltunk egy viszonylag egyszerű rendszert, melyben a CM15 peptid és a suramin szerves molekula vett részt. Ehhez elméleti szempontból hagyományos MD (all-atom MD, vagy MD) és durvaszemcsés (CG) szimulációkat végeztünk.



23. ábra. 4x4 db CM15 - suramin komplex kölcsönhatása PC és PC/PG lipid kettősrétegekkel. A pillanatképek teljes-atomos MD szimulációkból készültek. A PC lipidek fejcsoportjai narancssárgák, a PG lipideké kék. A peptidok zölden a suraminok lilán kerültek ábrázolásra.

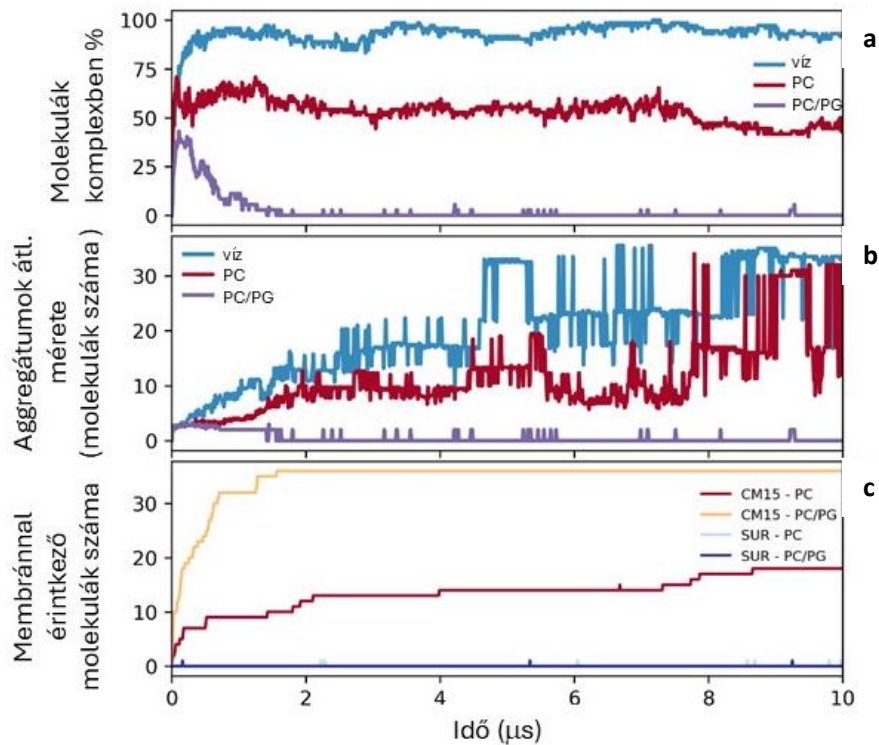
A háromkomponensű vizsgálatok között az MD szimulációk során 4-4 CM15-suramin molekulával alkotott komplexét vizsgálatuk vizes fázisban, majd PC és PC/PG lipid kettősrétegek jelenlétében (23. ábra). A vizes fázis szimulációja gyors asszociációs folyamatot mutatott. Membránok környezetében a szimuláció alatt a 4x4-es komplexek kialakulása majd azok lipid fejcsoport régióhoz történő kötődése is megtörtént.



24. ábra. CM15-suramin asszociátumok durvaszemcsés vizsgálati modelljei PC (bal) és PC/PG (jobb) kettősrétegek jelenlétében. A suramin molekulákat lila és piros gömbök jelölik, a CM15 gerincét zöld gömbök, az oldalláncokat sárgák alkotják. A PC és PG fejcsoportok rendre narancssárgák és ciánkékék.

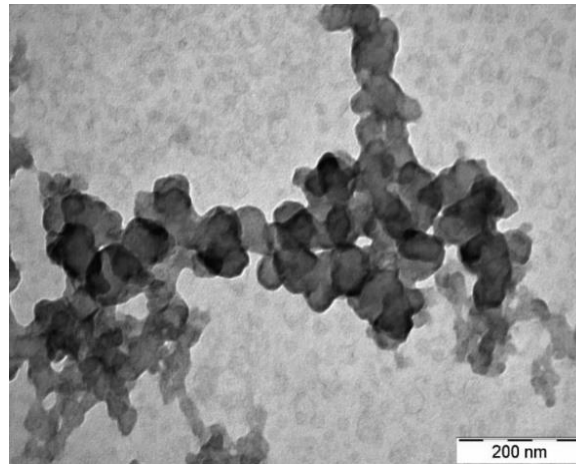
Az MD szimulációk értékes betekintést biztosítottak a tanulmányozott rendszerek jellegzetes kölcsönhatásaiba, azonban az aggregáció dinamikai folyamatainak tanulmányozásához szükséges volt egy közepes-méretű, 36 CM15 és 36 suraminból álló rendszer vizsgálata is. Ehhez CG számításokat végeztünk 10  $\mu$ s-os időskálán az all-atom MD-hez hasonló környezetben: vizes fázisban, és PC illetve PC/PG membránok jelenlétében (24. ábra). Ahogy az all-atom MD szimulációk is mutatták, az asszociátum kialakulását erősen befolyásolta a környezet (23. ábra). Vizes fázisban a CM15-suramin aggregátumok szinte azonnal képződtek, és - bár némi ingadozás a teljes asszociátum méretében megfigyelhető - a peptid és gyógyszer-molekulák nagy része a 10  $\mu$ s szimuláció teljes ideje alatt komplexekben maradtak (25. ábra a). Vizes rendszer követése során azt láthattuk, hogy a kezdeti kisebb komplexek a futás során folytonosan összeálltak nagyobbakká, amelyek végül nagy aggregátumokba tömörültek és ezek 34-35 peptidet tartalmaztak a szimuláció végére (25. ábra b). Ezzel szemben, a negatívan töltött PC/PG lipid kettősréteg jelenlétében, bár némi komplex képződés a szimuláció kezdetén megjelenik, későbbi szakaszokban ez szétesik és a suramin-CM15 aggregációra nem utal semmilyen jel. Itt a CM15 molekulák gyorsan kötődnek a lipid molekulákhoz, és a rendszer eléri az egyensúlyi állapotát  $\sim 1,8$   $\mu$ s után, ahol mind a 36 CM15 molekula kötődik a membránhoz (25. ábra c). A CM15 molekulák erős kölcsönhatása a lipidekkel megakadályozza őket abban, hogy aggregátumokat képezzenek suramin

molekulákkal, így utóbbiakat a szimuláció további részében a vizes fázisban szabadon mozognak. A három rendszer közül a legérdekesebb, a PC-s kettősréteggel végzett számítás. Ez a két előző rendszerhez képest éppen köztes állapotot tükröz. Bár néhány CM15 molekula kötődik a fejcsoport régióhoz, mások inkább aggregátumokat képeznek, ahogy azt az aggregációban lévő molekulák aránya és a membránfelszínhez kötődők száma mutatja. Itt sikerült egy tipikus kompetitív szituációt megfigyelni, ahol a suramin asszociátumok és a lipid kettősréteg versengenek a CM15 molekulákért.



25. ábra. A CM15–suramin aggregáció időbeli függése három különböző környezetben. a) A molekulák számának aránya a komplex asszociátumokban (36 CM15 és 36 suramin). b) Az aggregátumok átlagos mérete. c) Membránnal érintkező molekulák száma.

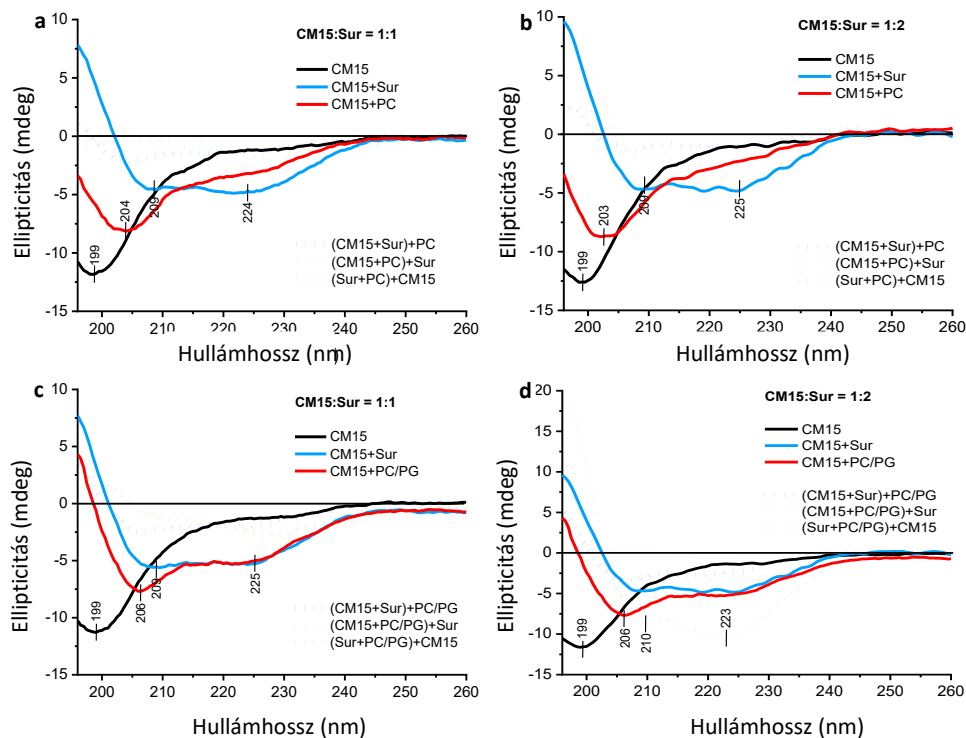
Annak érdekében, hogy kísérleti oldalról is megértsük fenti interakcióknak a struktúrára és a funkcióra gyakorolt módosító erejét, teszteltük a suramin hatását a CM15 membránaktivitására és antibakteriális hatékonyságára. Az aggregátumképződést transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) vizsgáltuk, amelyek 1-2  $\mu\text{m}$  átmérőjű formációkat mutattak, jellegzetes morfológiával (26. ábra). Ezek egy  $\sim 50$  nm-es gömbös építőelemekből álló hálózatot mutattak, amelyeket leginkább lineáris régiók kötöttek össze.



26. ábra. A CM15-Suramin 1:1 rendszer során képződött asszociátumok TEM felvétele

Hasonló kapcsolódási állapotot mutatott de inkább elágazó morfológiával az LL-37 RNS-sel képzett komplexekben (Ganguly et al. 2009). Ez azt sugallja, hogy pozitív töltésű amfilil peptidek, mint például a CM15 és az LL-37, könnyen képezhetnek szerteágazó, részlegesen rendezett aggregátumokat anionos partnerekkel, amelyeknek aromás gyűrűi vannak és korlátozott szerkezeti rugalmassággal rendelkeznek, úgy mint a gyógyszer molekulák vagy a nukleotidok. Meg kell jegyezni, hogy az ilyen morfológiájú részecskék specifikusan a CM15-suramin rendszerre voltak jellemzőek, és nem voltak megfigyelhetők a külön csak a peptideket, valamint a külön csak a gyógyszert tartalmazó oldatokban. A háromkomponensű rendszerek esetén a DLS mérések több száz nm-nél nagyobb méretű aggregátumok kialakulására mutattak rá. A nagy méretű részecskék jól érzékelhetők voltak PC liposzómák jelenlétében, de nem voltak olyan hangsúlyosak PC/PG liposzómákkal. A CD spektrumok alapján általánosságban megjegyezhető, hogy a liposzómákat tartalmazó minták spektrális jellemzői inkább a suramin-peptid komplexekéhez hasonlítanak, semmint a lipidhez kötött állapothoz, és a rendezetlen szerkezet – helikális szerkezet közötti átmenetet jelzik (27. ábra). Azonban egyértelmű különbségek figyelhetők meg, amelyek potenciálisan a peptidek kötődési preferenciájának tudhatók be. Az 1:2 CM15 : suramin arányú rendszerek esetén (27. ábra b és d) a peptidekhez való kötődésben egy kompetitív helyzet figyelhető meg ((Sur+lipid)+CM15), ahol a peptid–gyógyszer kölcsönhatás előnyben részesül a lipiddel történő interakcióval szemben. Ugyanakkor, a legintenzívebb jelet a PC/PG liposzómák esetében detektáltuk, akkor amikor a suramint kétszeres feleslegben adtuk hozzá a lipidhez már asszociált peptidekhez ((CM15+PC/PG)+Sur). Ez arra is utal, hogy a suramin képes fokozni a peptid helicitását, még akkor is, ha a peptid már a lipid kettősréteghez van kötődve.

Másrészt, a spektrális intenzitás változásai összefüggésben lehetnek az aggregációval, amelyet a kis molekulású vegyület indukál. A két- és háromkomponensű rendszerekből származó CD spektrális jellemzők alapján további információk nyerhetők a peptid kötődési tulajdonságairól. A háromkomponensű keverékeknel megfigyelt spektrális jellemzők, amelyek akár növelt intenzitású jeleket is adhatnak ((Sur+lipid)+CM15 és (CM15+PC/PG)+Sur) összhangban vannak egy olyan kötődési forgatókönyvvel, amelyben a peptidláncok nem kerülnek be a lipid kettősréteg apoláris belső terébe, hanem inkább tömegesen a kettősréteg víz-lipid határfelületén vannak. Továbbá, figyelembe véve a suramin társulást a vezikulákhoz, ahogy azt fentebb említettük, a peptid–suramin interakció a liposzóma felületén is előfordulhat.



27. ábra. A CM15 távoli-UV CD spektrumai suramin jelenlétében és hiányában. A kölcsönhatásokat kettő- és háromkomponensű keverékekben teszteltük, a), b) PC, és c), d) PC/PG liposzómák jelenlétében. A háromkomponensű rendszerekben először a zárójelben szereplő két vegyület előinkubációja történt, utána adtuk hozzá a harmadik vegyületet.

A következő alfejezetben részletesebben is foglalkozom a biológiai hatás és a molekuláris mechanizmusok közötti kapcsolatról egy kiemelt példán keresztül. Röviden azonban érdemes itt is megemlíteni, hogy a jelen tanulmány keretei között mind antibakteriális, mind citotoxicitást mérő esszék is elvégzésre kerültek. Ezek azt mutatták, hogy a suramin hozzáadása a CM15-höz csökkentette a peptid antibakteriális hatását, egyúttal – pozitív

járolékként – jelentősen csökkentette annak citotoxicitását is (Quemé-Peña et al. 2019). A biofizikai és szerkezeti *in vitro* vizsgálatok alapján a gyógyszer nemcsak az AMP másodlagos szerkezetét, hanem membránaktivitását is befolyásolja, ami összefüggésben lehet az antibakteriális aktivitás csökkenésével. Összességében az eredmények betekintést nyújtanak egy dinamikus rendszerbe, ahol a peptid kölcsönhatása a lipid kettős réteggel és a suramin molekulákkal versengő módon alakul, amelyben a peptid-suramin arány, valamint több más tényező, pl. a lipid vezikulák felületi töltése is befolyásolja az egyensúly kialakulását. Ez az észrevétel azt sugallja, hogy az eddig nem értett mellékhatások eredete azonosítható lehet, amikor pl. a suraminhoz hasonló paraméterekkel rendelkező gyógyszereket vizsgálunk.

A három komponensű rendszerek szimulációi alapján vízben a CM15-suramin rendszer könnyen nagy aggregátumot alkothat, azonban PC kettősréteg jelenlétében ezek kisebbek lesznek, néhány egyedi peptid pedig belép a fejcsoport régióba. Ez kvalitatíve megegyezik a kísérleti DLS vizsgálatokkal, illetve a CD spektroszkópiai vizsgálatokkal is, ahol inkább a nagyobb aggregátumok voltak megfigyelhetőek. Amennyiben a PC/PG rendszert nézzük, a CM15-suramin asszociátumok nem épülnek fel, inkább a kis kezdeti komplexek "beleoldódnak" a kettősréteg felszíni régióba. Ez szintén egyezik a DLS és CD megfigyelésekkel, ahol az aggregátumok mérete kisebb volt, illetve a lipid felszínhez való kötődés jobban tettenérhető. Bár csak egy adott rendszert vizsgáltunk, a megfigyelések általános aspektusai könnyen átültethetőek más hasonló rendszerekre is. Az utóbbi időkben történt kísérleti eredmények együtt a jelenlegi szimulációkkal azt sugallják, hogy az AMP-k gyakran jelen vannak potenciálisan ellentétes töltésű vegyületekkel az *in vivo* rendszerekben. Ekkor valószínűsíthető, hogy az asszociátumképzési hajlamuk miatt ezen vegyületek kevésbé toxikusak a gazdaszervezet semleges membránjaira. Azonban, ha közel vannak egy negatívan töltött, tehát pl. mikrobiális membránhoz, akkor az AMP-k monomerikus módon, vagy kisebb komplexek formájában beléphetnek a kettősrétegek felszíni régióba, membrán-toxicitást gyakorolhatnak a célorganizmusra. Bár a mechanizmus megértéséhez további tanulmányokra van szükség, a tény, hogy bizonyos AMP-k közepes méretű komplexekbe szerveződhetnek, amelyeknek más affinitása van a semleges és negatív töltésű membránokhoz, új megközelítést biztosíthat a gyógyszer-fejlesztéshez, ahol a peptidek a jövőben a racionális gyógyszertervezésben és a komplexképzésen alapuló formulázásban egyre növekvő szerepet kaphatnak.

Biológiai aktivitás és mögöttes mechanizmus (D7)

„T: I am sorry, but you should send an email to all co-authors about the submission. Given they are 22, it will take half an hour just to gather the addresses.

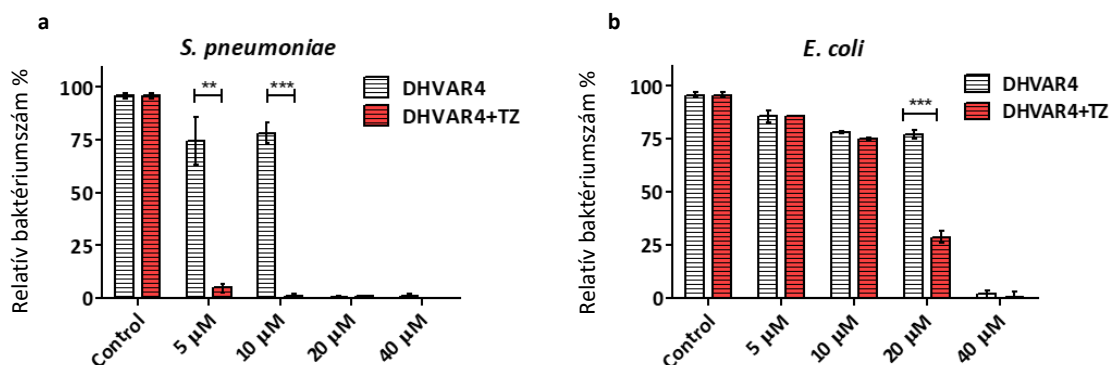
Maria: Ma dai, it's ok I can do it, no problem.

T: Excellent work from you by the way. Hope this will get out in time and help you get funded finally to start off here in Bp.

Maria: ... I do not think I will try again Tamas. It has been great here, but I tried with MC and PD several times, so we decided with my fiancé to move on from Hungary...

T: Ugghh, OK.. yeah, no problem.. I guess.. OK, mmm, let's get back to this later...”

A korábbiak alapján felmerült, hogy az antimikrobiális peptidok aktivitásának növelése esetleg elérhető asszociátumok képződésével. Ezzel kapcsolatban az irodalomban ismert, hogy aktív konformációjuk támogatásával, például rögzített szerkezetekkel (stapled peptides), vagy gyűrűképzés (cyclic peptides) által antimikrobiális aktivitásuk sok esetben növelhető (Morrison 2018). Ezen gondolatok mentén megvizsgáltuk, hogy az általunk ismert rendszerek esetén lehetséges-e, hogy a peptid-kismolekula asszociátumok a peptid antibakteriális hatásának növelését érik el. Ehhez esettanulmányként vizsgáltam, hogy néhány anionos élelmiszer-adalék, például a tartrazin (TZ) és az amaránt (AmTH), és egy nyálban található gazdavédő peptidekből származtatott AMP, a DHVAR4 (*histatin-derived peptide variant 4*), kölcsönhatásai milyen módon befolyásolják a peptid aktivitását. Meglepetésünkre, ez a kölcsönhatás jelentősen növelte az antibakteriális hatást mind Gram-pozitív, mind Gram-negatív baktériumokra nézve, míg emlős sejtek esetén nem tapasztaltuk a toxicitás növekedését (28. ábra)

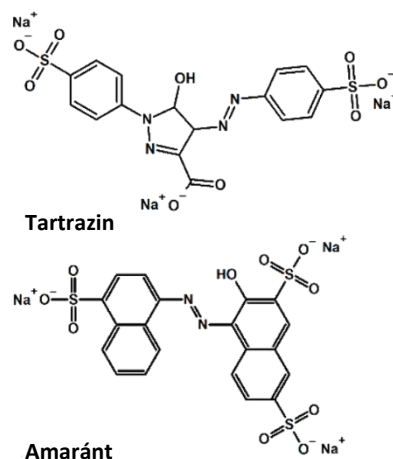


28. ábra. A DHVAR4 TZ komplex rendszer antibakteriális hatékonysága Gram pozitív (a) és Gram negatív (b) baktériumok ellen. Referencia: A DHVAR4 AMP egyedül mért antimikrobiális hatása.

A mechanizmus jobb megértéshez a DHVAR4 és az élelmiszer-színezékek közötti kölcsönhatást, összesen hat élelmiszer festékkel vizsgáltuk. Az emberi felhasználásra

jóváhagyott élelmiszer-adalékanyagok között az azo-vegyületek pH-függően negatívan töltöttek, és széles körben használatosak élelmiszerek és gyógyszerek színezésére (Saleh et al. 2016). Aromás gyűrűk vannak összekötve N=N kötéssel, és többek között ismert, hogy interakcióba lépnek biomakromolekulákkal (Al-Shabib et al. 2018; Basu and Kumar 2015; Basu and Suresh Kumar 2017). Az elsődleges tesztek azt mutatták, hogy elvileg minden élelmiszer-színezék pozitív hatást gyakorol a peptid aktivitásra 1:1 molarányban. A bakteriális mérések alapján a tartrazin (TZ) mutatta a legnagyobb hatást. Referencia vegyület kiválasztásához ellenőriztük az összes festék általános fizikokémiai tulajdonságait, mint például a töltés, a hidrofób és polarizált régiók szerkezeti eloszlása, és a jelenlévő funkcionális csoportok természete. Ennek megfelelően az amaránt mutatott legnagyobb hasonlóságot a TZ-hez a fenti kémiai paraméterek tekintetében és így az AmTH is kiválasztásra került a további vizsgálatokhoz (29. ábra).

A kezdeti CD spektrumok alapján a két ételfesték inkább aggregációt okoz a DHVAR4-el történő kölcsönhatás során, semmint konformációváltozást. A két peptid-ételfesték kölcsönhatását ezért tovább vizsgáltuk PC/PG lipid kettősréteg esetében is, mely egyszerűsítő modellje a mikrobiális membránoknak. Ekkor azt találtuk, hogy maga a membrán már eleve helikális konformációba rendezi a peptidet, azonban a két kiválasztott ételfesték ezt a helicitást tovább képes növelni, méghozzá egy titrálás mentén koncentrációfüggően. Ez alapján a DHVAR4-TZ illetve AmTH kölcsönhatás a membránon valószínűleg olyan molekularészletek között jön létre, melyek erősítik a peptid helikális jellegét.

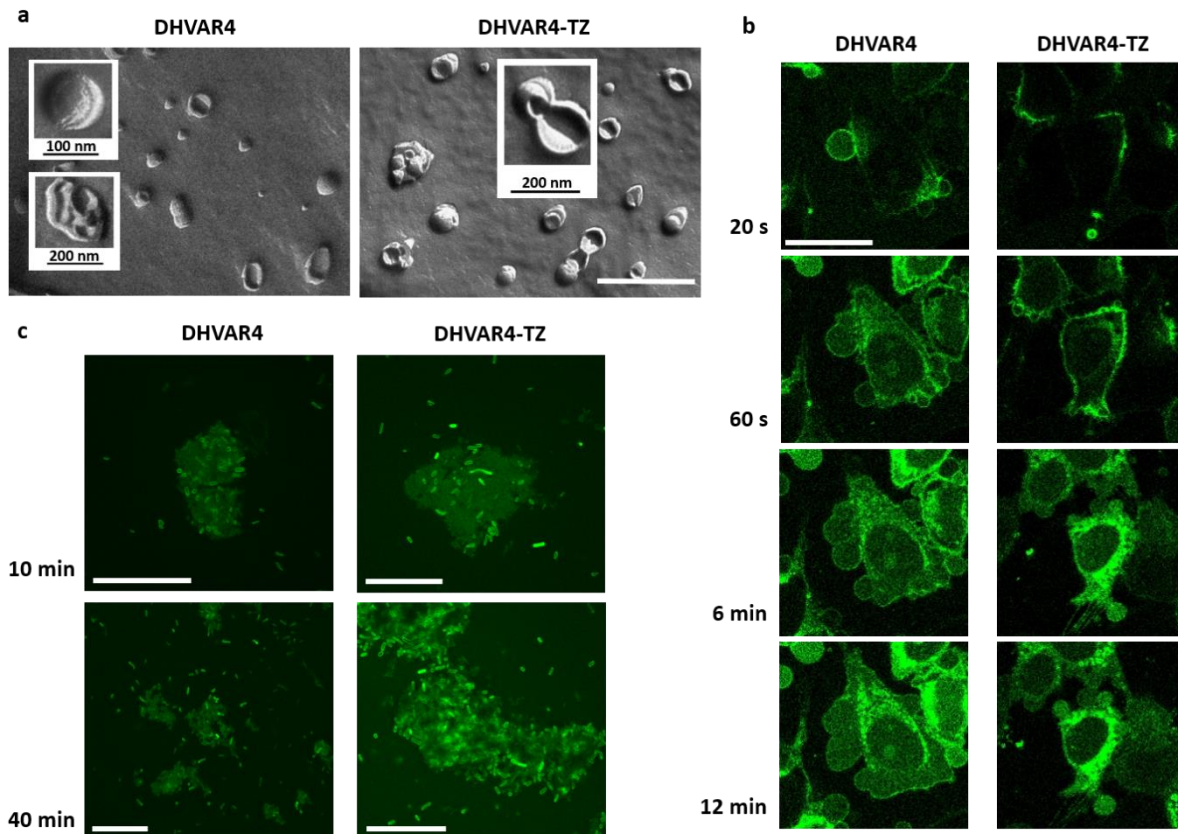


29. ábra. A tartrazin és az amaránt szerkezeti képlete

A PC/PG-vel végzett kísérletek során vizsgáltuk a DHVAR4 morfológiára gyakorolt hatását is. A fagyasztva töréshez kapcsolt TEM képek (FF-TEM) azt mutatták, hogy már DHVAR4

jelenlétében is megváltozik a szabályos liposzóma morfológia (30. ábra). A 80-140 nm átmérőjű egyrétegű liposzómákon kívül gyakran találhatóak oligo- és többrétegű vezikulák (MLV, multi-layered vesicles) is. A DHVAR4-nek az anion membránokkal való interakciója a felületi töltés semlegesítésével serkentheti a liposzómák közötti érintkezést; ez eredményezheti a közeli membránok összeolvadását, ami pedig vegyes morfológiájú hemifúziós köztes állapotok kialakulásához vezet. Érdekes módon, ha TZ is jelen van, akkor két- vagy három vezikulából álló csoportok láthatók, melyek egymáshoz hemifúzióval egybekapcsolt membránokon keresztül kapcsolódnak (30. ábra).

Továbbmenve vizsgáltuk, hogy milyen a komplex sejteken kifejtett hatása. Először megállapítottuk, hogy a TZ-nak egyedül nincs antibakteriális hatása a tesztelt koncentrációtartományban. A DHVAR4 keveréke TZ-vel a humán modell-sejtvonalon (MonoMac6) nem mutatott megnövekedett citotoxicitást. A vizuális azonosításhoz konfokális mikroszkóppal HeLa sejteken vizsgáltuk a rendszer hatásmechanizmusát. A HeLa sejteket gyakran használják morfológiai tanulmányokhoz (Zhong et al. 2012), mivel ezek jóval nagyobbak és deformálhatóbbak a baktériumoknál, ám ezek külső sejtburka ugyanígy részlegesen negatívan töltött ezáltal jobb lehetőséget biztosítva a mechanikai események gyors látványos vizsgálatára. Bár a peptid internalizációja nagyon hatékony volt, ez nem okozott jelentős növekedést a halott sejtek populációjában a vizsgált időkeretben. Az eredmények azt mutatták, hogy a peptid-felszívódást a TZ nem befolyásolta jelentősen. Részletesebben vizsgálva, azonban a festék befolyásolja a „blebképződést”. Az AMP-vel TZ nélkül kezelt sejtek esetében a blebek 1-2  $\mu\text{m}$  nagyságú vezikulákká nőnek, amelyek a végleges stádiumba érve ezek fúziójával jár. Annexin V affinitásvizsgálatok azt mutatják, hogy a blebképződés kapcsolódik az elsődleges apoptotikus eseményhez. Érdekes módon, amikor a sejteket a DHVAR4-TZ komplexszel kezeltük (30. ábra), a sejtmembránon a bleb kitüremkedések mérete jelentősen kisebb, és a tanulmányozott időkeret végén lévő terminális buborékok kevésbé hajlamosak a fúzióra. Ugyanakkor kvalitatív alapon úgy látszik, hogy jóval több „bleb” képződik, mint amikor csak DHVAR4-el kezeltük a sejteket. Utóbbi megfigyelés szorosan összefügg a DHVAR4-TZ PC/PG modell membránokra gyakorolt hatásának eredményeivel.



30. ábra. A membrán morfológiájának változása a modell liposzómákon, emlős- és bakteriális sejteken. (a) FF-TEM kép PC/PG unilamelláris liposzómákról DHVAR4 és DHVAR4-TZ jelenlétében. Méretskála: 400 nm. (b) Time-lapse konfokális mikroszkópos vizsgálatok HeLa sejteken 5  $\mu$ M Cf-DHVAR4 vagy Cf-DHVAR4-TZ hozzáadása után. Méretskála: 10  $\mu$ m. (c) Konfokális mikroszkópos képek agglutinálódott *E. coli* sejtekről, Cf-DHVAR4 és Cf-DHVAR4-TZ kezelés után. Méretskálák: 25  $\mu$ m.

Végezetül az egyes sejteken történő aktivitás mellett vizsgáltuk a sejtközösségre gyakorolt hatást is. Az első tíz perc során a DHVAR4 vagy a DHVAR4-TZ közvetlen közelében tartott baktériumsejtek hasonló méretű és morfológiai klasztereket képeztek. Negyven perc elteltével azonban már nagyobb és kompaktabb klasztereket észleltünk a DHVAR4-TZ rendszer esetében. Utóbbi növelte a sejt-sejt kapcsolatot és az agglutinációt az *E. coli* sejtek között. Valószínűsíthető, hogy a teljes antibakteriális mechanizmus során a DHVAR4-TZ kationos aggregátumok először segítik a kezdeti sejt agglutinációt, majd ezután az aggregátumok kisebb peptid-ételfesték komplexekké darabolódnak, melyek idővel közvetlenül beleoldódnak a körülöttük felgyülemlt bakteriális sejtekbe.

Összességében kimutattuk, hogy az AMP aktivitás módosítható ételfesték molekulák által. Mindeközben betekintést nyerhettünk a komplexképzéshez kapcsolódó molekuláris kölcsönhatásokba és a sejtszintű mechanizmusokba. Amikor a TZ komplexeket képezett a DHVAR4-el, akkor a toxicitás növekedett mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumok esetén, míg emlős sejtekkel szemben nem. A biokémiai eredmények azt

mutatják, hogy a közvetlen mechanizmus a DHVAR4-TZ komplexek membrán kölcsönhatásához kapcsolódik, ahol a peptid növekvő helikális jellegét a TZ hatásának köszönheti, amely koordinálja a bázikus és hidrofób aminosavakat. Az ennek eredményeként megjelenő AMP-fosfolipid hidrogén kötések megzavarják a kettősréteg integritását, ami egy szabályozottabb blebképződéshez vezetett a célsejtek membránján. A kevert antibakteriális összetevőkre megfigyelt szinergikus hatásokkal szemben ez egy alapvetően más mechanizmus, ahol a TZ közvetlenül befolyásolja a membránon található AMP-t, amely elősegíti a biológiailag aktív helikális konformációt. A jelenlegi álláspont szerint azonban még további kérdések maradtak nyitva, továbbá más aspektusok, például a jelentősen eltérő moláris arányoknál mért baktericid hatás sem tisztázott. A nyálban vagy bélben lévő AMP aktivitás manipulációja olyan kis molekulák által, amelyek emberi fogyasztásra hivatalosan alkalmasak, izgalmas új irány, amelynek jelentősége lehet a gazdatest védelemben például élelmiszer alapú bakteriális fertőzésekkel szemben.

## Nem természetes peptidek

„ *Tarczay Gyuri (ELTE 5-ik emelet, szuper dunai kilátás): Látom az utolsó spektrumot fél ötkor vetted fel. Mikorra értél haza?*

*T: -Hét után. Viktor, az öcsém, meg Zoli hozott néhány sört és megvártuk a napfelkeltét is ha már így alakult.*

*Gy: - Hát igen, vajon miért is nehéz találni embert mátrix IR projektekhez?...*”

A korábbi tanulmányok rámutattak arra, hogy a természetes peptid- és fehérjerendszerek esetén tapasztalt másodlagos szerkezeti elemek kialakításának komplex jelensége átültethető olyan peptidszármazékokra is, melyek a természetben széles körben nem elérhetőek. A teljesség igénye nélkül ide soroljuk az aminosavak homológ sorában szereplő aciklusos  $\beta$ -,  $\gamma$ -, stb. aminosavakból rendre felépülő  $\beta$ -,  $\gamma$ -, stb. peptideket, valamint a szintén peptidcsoportot tartalmazó, de egzotikus -, gyakran ciklusos- molekuláriszletekkel rendelkező rendszereket, például aminociklohexán karboxisav (ACHC) és aminociklopentán karboxisav (ACPC) származékait, vagy ún. triazol gyűrűket tartalmazó aminosavakból felépülő peptideket (Appella et al. 1999; Sang and Cai 2023; Keresztes et al. 2008). A kétezres évek során egyértelműen bebizonyosodott, hogy ezek a rendszerek nagyon változatos másodlagos szerkezeti elemeket képesek kialakítani és valószínűsíthetővé vált, hogy a magasabb szerkezeti egységek elérése is a természetes peptidekhez hasonló koncepciót követhet. Ugyan néhány úttörő tanulmány bemutatott izgalmas harmadlagos szerkezeti jelleget mutató rendeződéseket (Wang et al. 2014; Martinek and Fülöp 2012), a részletekbe menő vizsgálatra alkalmas példamennyiségtől még távol állunk. A diverz építőelemek miatt különösen igaz ez a mély neurális hálózatokra támaszkodó gépi tanulási projektek indításához szükséges adatmennyiségre. Noha a közelmúltban felállítottuk az első nem természetes adatbázist (FoldamerDB, (Nizami et al. 2019)), a probléma továbbra is adott: a területen még nem alkalmazhatóak pl. az Alfafoldhoz hasonló prediktív algoritmusok. Mindazonáltal várható, hogy magasabb szerveződési szintjük még inkább változatos tulajdonságokat mutat majd. A terület kutatásának praktikus motivációját természetesen az adja, hogy ezek a rendszerek mind orvosi biológiai alkalmazások irányába, mind új, önrendeződő nanomérettartományú lágyanyagok kialakítása felé jelentős potenciált mutatnak, ahol gyakran lehetőség nyílik dedikált alkalmazások során a természetes peptidek hátrányát kiküszöbölő, a nem természetes peptidek előnyét pedig kihasználó kombinációk elérésére. Ez a fejezet a fenti rövid felvetés tükrében foglalja össze kezdeti lépéseinket a nem természetes peptidrendszerek önszerveződő tulajdonságainak jobb megértése felé, amelyben elsőként a homológ sor legegyszerűbb tagjait, az aciklusos  $\beta$ -aminosavakból felépülő  $\beta$ -peptideket vizsgálom.

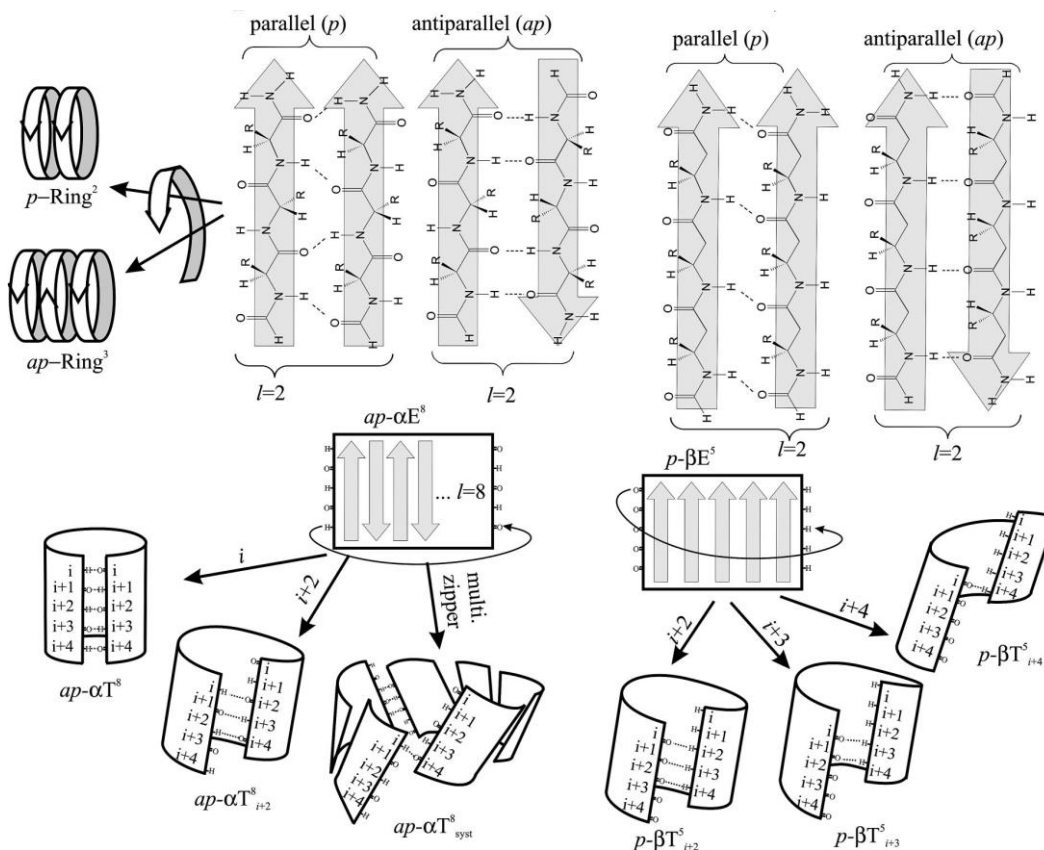
## $\beta$ -peptidek asszociátumai

Membránaktív oligomerek vázszerkezete - kezdeti elméleti számolások (D8)

„T (ELTE 427es szoba): Ez elég nagy baromság. A negyedik elméleti cikket írom valamiről ami nem is létezik.

András (Perczel): Majd egyszer valaki megcsinálja kísérletesen is. Hajrá kedves BT!”

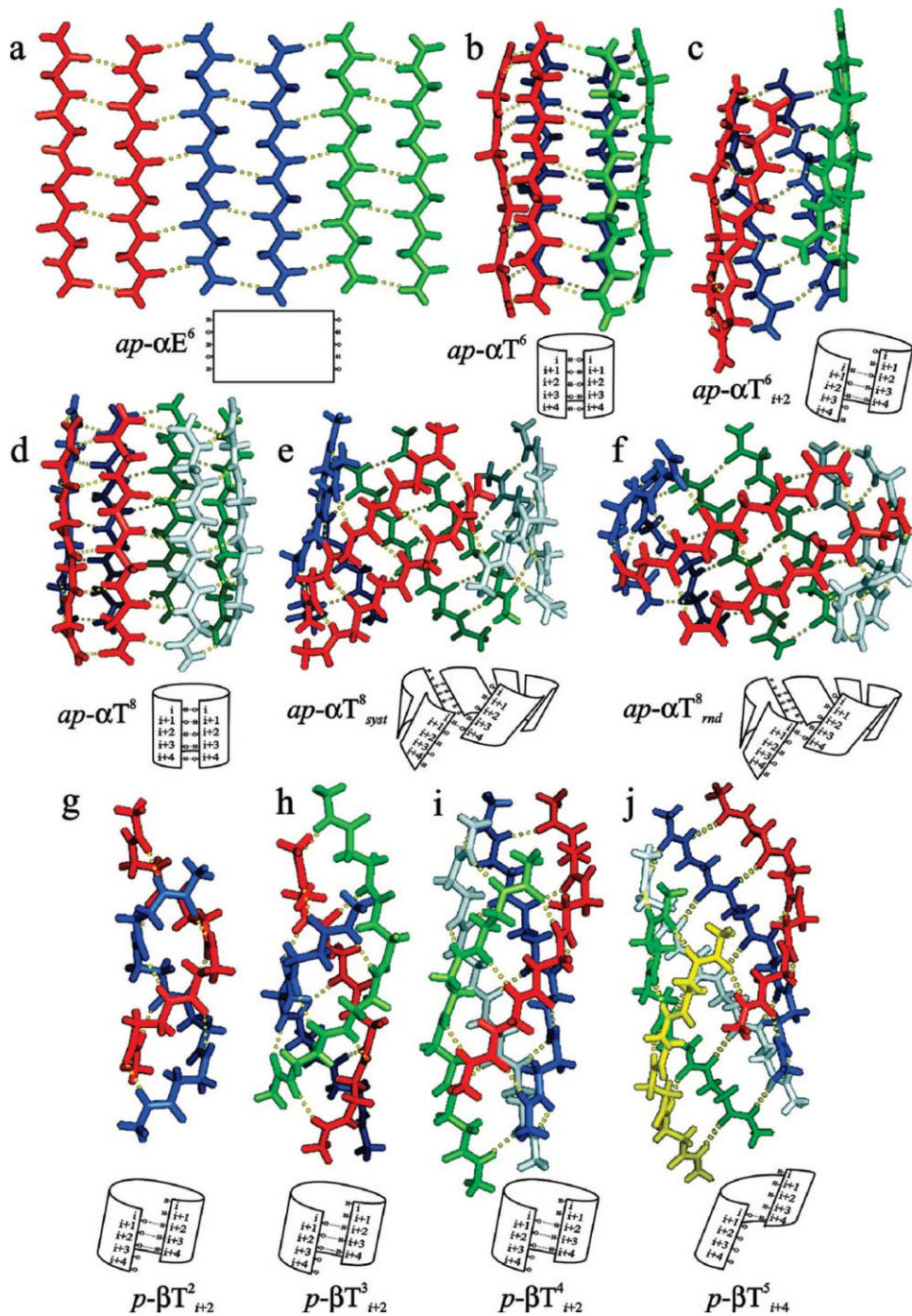
Az önszerveződő peptid-alapú mesterséges nanorendszerek racionális, alulról-felfelé tervezésének támogatása érdekében vizsgáltam a különböző redőzött rétegből felépült nanocsövek szerkezeti és energetikai tulajdonságait. Ehhez első körben kvantumkémiai számításokat végeztünk nagyméretű modelleken, és megjelenítettük a nyújtott  $\beta$ -redőkből származó struktúráktól a  $\beta$ -hordófehérjék molekuláris keretéig terjedő szerkezeteket.



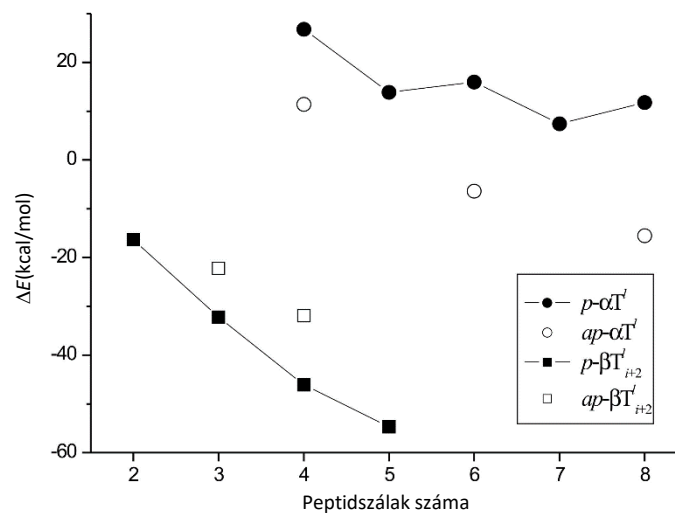
31. ábra. Redőzött rétegekből felépíthető peptid hordó asszociátumok vázlatos áttekintése az  $\alpha$ - (bal) és  $\beta$ -peptidek (jobb) esetében. A lineáris peptidkekből álló nanocsöveket (T), elméleti szinten egy kinyújtott redőzött rétegből (E) feltekerve lehet előállítani. Az  $\alpha$ -peptideknél az oldalláncok iránya váltakozik, a  $\beta$ -peptideknél az oldalláncok iránya egységes. Csavarodott csöveket eltolódott H-híd mintázatokat kapcsolnak össze. A nevezéktan részleteit lásd (Beke et al. 2008).

A számításokhoz felhasznált rendszerekre összehasonlítottuk az  $\alpha$ - és  $\beta$ -peptidek alkotta önrendeződött szerkezetek relatív energetikai stabilitását (31. ábra). Meglepő módon az elméleti számítások alapján a nem természetes  $\beta$ -peptideknek nagyobb az affinitása a

nanocsövek (T) kialakítására, mint a természetes peptideknek. Vizsgáltuk mindkét rendszer stabilitását, attól függően, hogy az adott vázszerkezet (i) parallel vagy antiparallel orientációjú-e, (ii) hány peptidláncból áll, és (iii) milyen hidrogénkötési mintázatot képez. Amikor összehasonlítottuk ezen peptidek hordószerű alakzatait a nyitott redőzött réteghez (E) képest a hordórendszerek felé való affinitás sokkal nagyobb volt a  $\beta$ -peptidek esetében: a nyitott redőzött réteg szerkezetéhez viszonyítva egy energetikailag stabil nanocső szerkezet kialakításához szükséges szálak száma hat  $\alpha$ -peptidek esetében, de csak kettő  $\beta$ -peptidek használatakor (4. táblázat, 5. táblázat és 31. ábra, 32. ábra)! A legstabilabb hordó nanocsövek relatív energiáját összehasonlítva azt látjuk, hogy a nyolc szás  $\alpha$ -peptid csőnek 15,5 kcal/mol stabilizációs energiája van, míg ez az érték 54,7 kcal/mol az öt szás  $\beta$ -peptidből álló cső esetében (33. ábra). Továbbá,  $\alpha$ -peptidek esetében a különböző csövek relatív stabilitásának különbsége arányos a hidrogénkötések számával, míg a  $\beta$ -peptidek esetében az egyre csavartabb 3 és 4 szálú csövek jelentős energianyereséget mutatnak, annak ellenére, hogy a H-kötések száma csökken (Beke, Csizmadia, et al. 2006). Ez egy meglehetősen szokatlan jelenség, amely részben magyarázható a csavarodottabb csövek javított geometriai tulajdonságaival és a kialakított H-kötések alapvető paramétereinek javulásával. A belső átmérőt figyelembe véve a 6 szás antiparallel  $\alpha$ -peptid cső esetében, ha a H-kötések zipzár eltolása  $i$ -ről  $i+2$ -re nő, az átmérő  $D=8,6$  Å-ról  $9,2$  Å-ra emelkedik. Ezzel szemben a hasonlóan nagy eltolás  $i+2$ -ről  $i+4$ -re 5 szás  $\beta$ -peptid csövek esetében  $D$   $8,8$  Å-ról  $10,3$  Å-ra nő, ami megegyezik a 7 szás kicsavarodott természetes peptid cső értékével (Beke et al. 2008). Feltehetően a nanocsövekben jóval kevesebb  $\beta$ -peptid szálra lenne szükség ahhoz, hogy akkora belső átmérőjű hordó szerkezetet érjünk el, mint a természetes peptid rendszerek esetében. Megjegyzendő azonban, hogy bár ezek közös kiindulási szerkezeti eleme a természetes  $\alpha$ -peptidek esetében a nyitott  $\beta$ -redőzött réteg, a  $\beta$ -peptidek hasonlóan kiterjesztett redőzött szerkezete nem kapható meg mint teljesen relaxált energiaminimum, azt csak bizonyos atomok rögzítésével sikerült stabilizálni az elméleti felvetés alátámasztásához (Beke et al. 2004; Beke, Csizmadia, et al. 2006; Beke, Somlai, et al. 2006). Többek között ez is lehet az oka annak, hogy ekkora stabilizációs különbséget látunk a két rendszer között felcsavarodás esetén.



32. ábra. Kiválasztott kvantumkémiai számolásokkal optimalt szerkezetek a vizsgált  $\alpha$ - és  $\beta$ -peptid modellek közül. a)-f) 6 és 8  $\alpha$ -peptid szálból álló antiparallel redőből származó szerkezetek. g)-j) 2-5  $\beta$ -peptid szálból álló parallel szerkezetek. Az egymás melletti peptid szálok azonos színnel vannak jelölve, a hidrogénkötések pedig szaggatott sárga vonallal. A nevezéktan részleteit lásd (Beke et al. 2008).



33. ábra. A legstabilabb lineáris  $\alpha$ - és  $\beta$ -peptidcsövek relatív energiái (B3LYP/6-311++G(d,p) szinten) a peptidláncok számának függvényében. A relatív energiákhoz referencia a nyílt redőzött rétegű szerkezetek energiája. A nevezéktan részleteit lásd (Beke et al. 2008).

A fentiekben felül érdemes néhány további általános szerkezeti tulajdonságot figyelembe venni a két peptidrendszer kapcsán: az  $\alpha$ -peptidek oldalláncainak orientációja váltakozik, ami azt eredményezi, hogy az egyik oldallánc a külső mátrix felé mutat, míg a következő az a cső belső része felé (34. ábra). Ezzel szemben, a  $\beta$ -peptidek ugyanazon gerincatomon található oldalláncai egységesen egy irányba állnak. Emellett fontos részlet, hogy egy  $\beta$ -aminosav esetében a gerincben mind a 2-ik, mind a 3-ik szénatom funkcionálizálható akár egyszerre is (Martinek and Fülöp 2012), ami azt eredményezhetné elméleti szempontból, hogy az egyik oldallánc a belső tengely felé mutat, a másik pedig a külső mátrix felé (31. ábra, 34. ábra). Az  $\alpha$ -peptidek csőttestének az antiparallel elrendezés a kedvezőbb gerincváz, míg a  $\beta$ -peptidek esetén a parallel orientáció a preferált. Az alkalmazott oldalláncok és az oldószer nagy hatással van mindkét rendszer esetén ezen szerkezetek energetikai preferenciájára, azonban a további paraméterek elemzése meghaladta az elméleti számolások kereteit.

4. táblázat. A vizsgált  $\alpha$ -peptidek relatív energiái  $[\text{HCO}-(\text{Gly})_4-\text{NH}_2]_l$  ( $4 \leq l \leq 8$ ), a B3LYP/6-311++G(d,p)//RHF/3-21G elméleti szinten számolva. A további részleteket lásd (Beke et al. 2008)

Szerkezet	peptidek száma	aminosav/peptid	$\Delta E$ (kcal/mol)
<i><math>\alpha</math>-peptidek</i>			
antiparallel nyitott redő			0,0
parallel nyitott redő	4	4	8,0
antiparallel cső			9,8
parallel cső			25,2
parallel nyitott redő	5	4	0,0
antiparallel nyitott redő			13,9
antiparallel nyitott redő			0,0
parallel nyitott redő			14,5
antiparallel cső	6	4	-6,4
parallel cső			16,0
antiparallel cső (i+2 H-kötés mintával zárva)			2,9
parallel nyitott redő	7	4	0,0
parallel cső			7,4
antiparallel nyitott redő			0,0
parallel nyitott redő	8	4	7,8
antiparallel cső			-15,5
parallel cső			11,8

5. táblázat. A vizsgált  $\beta$ -peptidek relatív energiái  $[\text{CH}_3\text{CO}-(\beta\text{-Ala})_4-\text{NHCH}_3]_l$  ( $2 \leq l \leq 5$ ), a B3LYP/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-31G(d) elméleti szinten számolva. A további részleteket lásd (Beke et al. 2008)

Szerkezet	peptidek száma	aminosav/peptid	$\Delta E$ (kcal/mol)
<i><math>\beta</math>-peptidek</i>			
parallel nyitott redő			0,0
parallel cső (i+2 H-kötés mintával zárva)	2	4	-16,3
parallel nyitott redő			0,0
parallel cső (i+2 H-kötés mintával zárva)	3	4	-32,2
antiparallel cső (i+2 H-kötés mintával zárva)			-22,2
parallel nyitott redő			0,0
parallel cső (i+2 H-kötés mintával zárva)	4	4	-46,1
antiparallel cső (i+1 H-kötés mintával zárva)			-31,9
parallel nyitott redő			0,0
parallel cső (i+2 H-kötés mintával zárva)			-54,7
parallel cső (i+3 H-kötés mintával zárva)	5	4	-45,1
parallel cső (i+4 H-kötés mintával zárva)			-31,3

## Membránaktív rendszerek dinamikus asszociátumai (D9)

„Prof. Fülöp Ferenc (Szeged, tanszékvezetői szoba): - Diszubsztituált aminosavakból nem tudjuk szintetizálni ezeket a peptideket.

T(egy bőrfotelt megosztva, együtt ülve egy ember méretű papírtoronnyal): Értem, hát akkor nem tudom hogyan fog csövet képezni... És ha csak a kiralitást változtatjuk végig  $\beta$ -asokban?

István (Mándity): Az már működhet. Mit tudsz ebből te csinálni?

T: Esetleg bemérem az aminosavakat, az megvan két-három óra alatt...

István (Felnevet): Neked mi két óra a bemérésen? Tudod mit ne fáradj, megcsinálom én. „

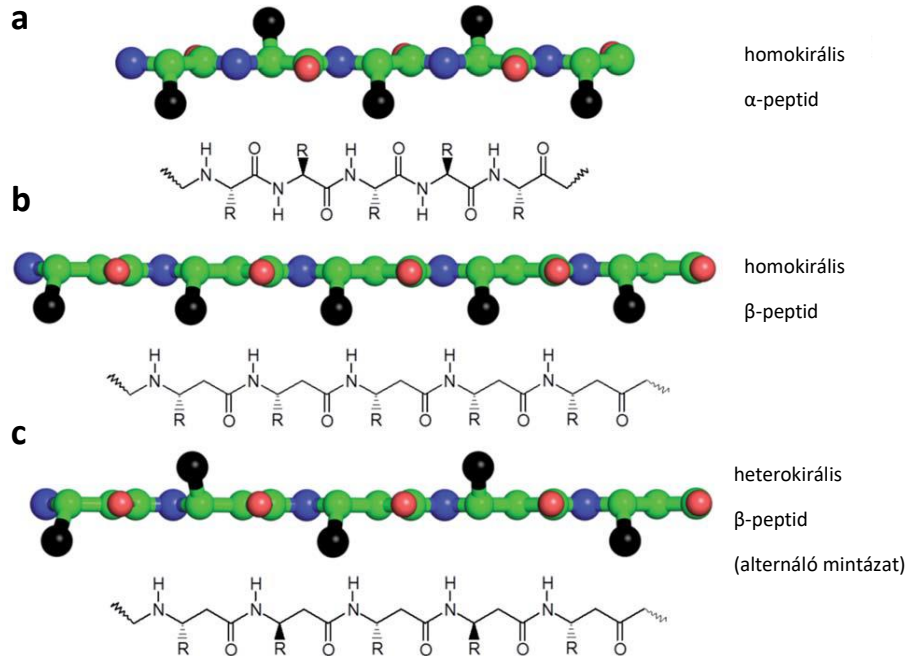
„(Három év múlva, TTK) Judith: Vért izzadtam az IR spektrumok második deriváltjaival, és azt hiszem összeraktam nektek melyik rendszerben milyen konformációnk is van, és ezek alapján hogyan is épülnek fel az oligomereid. Tudom, hogy Imola első szerző lesz, de azt kérném, hogy második szerző legyek.

T: Bármit, ha ez a nyavalyás cikk egyszer összeáll...”

A fentebb felvetett elméleti számolások mentén kerültem abba a helyzetbe, hogy megpróbálok hasonló oligomereket kísérleti úton is létrehozni. Ehhez fontos volt figyelembe vennünk, hogy az elméletben létező cső alakú rendszerek számolásánál nem ismert a rendszer helikális, illetve oligomer formában töltött szabadentalpiája. Ez azért releváns, mert mint korábban bemutatásra került, a  $\beta$ -peptidek esetében fentebb bemutatott módon nagy affinitása van a hélixképzésre. Ennek elkerüléséhez olyan szerkezetet kellett terveznünk, mely monomer állapotban is inkább a nyújtott, vagy rendezetlen konformációt részesíti előnyben. Ehhez érdemes figyelembe venni, hogy az ide vonatkozó, a természetes aminosavakból álló peptidek és fehérjerészletek  $\beta$ -redőzött réteg kialakításához szükséges egyik legfontosabb tulajdonsága a nem természetes  $\beta$ -peptidekkel szemben az, hogy a nyújtott peptidgerinc mentén az egyes oldalláncok váltakozva helyezkednek el (34. ábra).

Ezzel szemben a homokirális  $\beta$ -peptidek esetén nyújtott peptidgerincnél azonos oldalon jelennek meg az oldalláncok, mely szterikus okok miatt eleve egy feltekeredő, elhajló térszerkezeti altér felé tolja el a rendszert. Ehhez még figyelembe véve, hogy az oldalláncot tartalmazó  $\beta$ -aminosavak esetén a nyújtott konformáció nem stabil energiaminimum, hanem átmeneti állapot (Beke et al. 2004) már kvalitatív módon is intuitíve adódik a magas hélix affinitás. Éppen ezért, olyan heterokirális rendszereket terveztünk, melyeknek hidrofób és hidrofil oldalláncai az alternáló kiralitás miatt váltakozva az ellentétes oldalra kerülnek. Ciklusos  $\beta$ -peptidek esetében a fixen tartott alternáló kiralitású rendszerről kimutatták, hogy a lapos,  $\beta$ -redőzött réteghez hasonló szerkezeti elem elérhető, ám az is kimutatásra került, hogy ezek a természetes peptidek amiloid fibrillumjaihoz hasonló módon végtelen szálakat eredményeznek (Martinek et al. 2006). Ezt elkerülendő, a tervezett hexapeptidek két első N-terminális aminosava esetén azonos kiralitást terveztem be, melyektől remélhető volt, hogy

megakadályozza a végtelen redőbe történő rendeződést. A kezdeti szekvenciákat folyamatosan optimáltuk (1-5), míg az 5-ös peptid esetén elértük, hogy egyszerre tartalmazott négy hidrofób aminosavat, miközben nagy mértékben volt vízoldható (35. ábra)

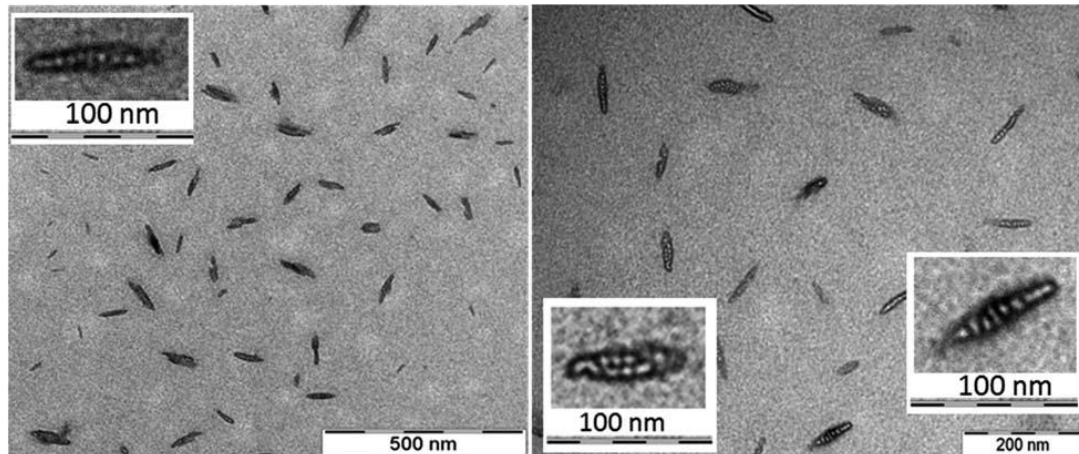


34. ábra. Természetes és  $\beta$ -peptidek oldallánc orientációja nyújtott szerkezetek esetén az alkalmazott kiralitás-mintázat függvényében.

	1	$R^1$ - $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>S</i> )-Gln- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Phe- $\beta$ -(3 <i>S</i> )-Gln- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Nab-NH <sub>2</sub>	HFIP PC, PCPG
	2	$R^1$ - $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>S</i> )-Glu- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>S</i> )-Arg- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu-NH <sub>2</sub>	AcOH:H <sub>2</sub> O PCPG
	3	$R^2$ - $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>S</i> )-Glu- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>S</i> )-Arg- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu-NH <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O PCPG
	4	$R^2$ - $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>S</i> )-Glu- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>S</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Arg-NH <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O PCPG
	5	$R^2$ - $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>S</i> )-Glu- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu- $\beta$ -(3 <i>S</i> )-Lys- $\beta$ -(3 <i>R</i> )-Leu-NH <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O PCPG MeOH, 1-Octanol

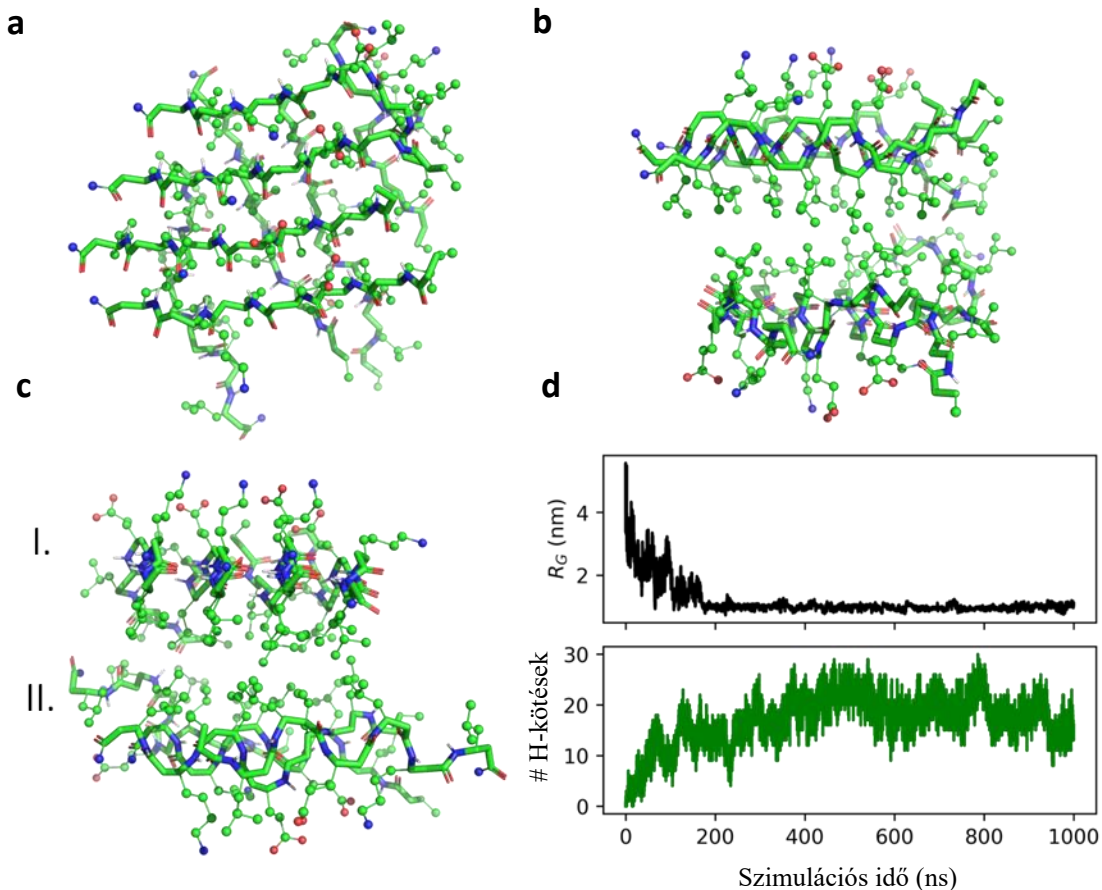
35. ábra. Kezdeti membránaktív, alternáló kiralitású és semleges töltésű  $\beta$ -peptidek és az azokat feloldani képes oldószerek, liposzomális rendszerek.

Az 5-ös peptid esetén vizes fázisban megállapítottuk, hogy a rendszer oligomerizálódik, ám önszerveződése egy részüknél megáll ~100 nm-es „tűszerű” rendszereket alkotva (36. ábra). Ezen felül a nagyobb felbontású képek megmutatták, hogy ezen rendszerek további 8-10 kisebb alegységből állnak. IR spektroszkópia segítségével kimutattuk, hogy intermolekuláris hidrogén-hidak vannak jelen a kialakult asszociátumokban.

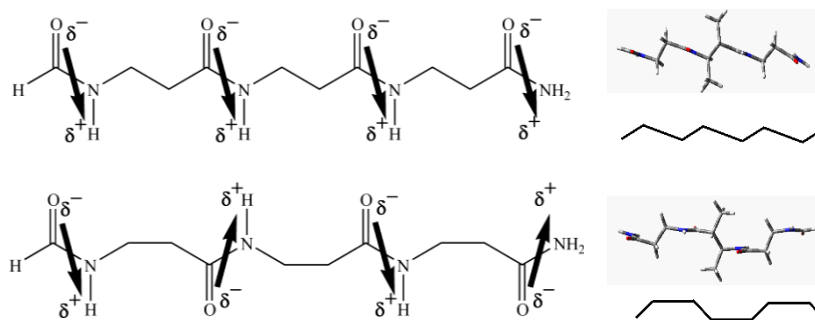


36. ábra. Az 5-ös peptid által formált tűszerű morfológiák elektronmikroszkópos képei.

Diffúziós NMR technikával meghatároztuk, hogy hozzávetőlegesen ~4-10 peptid alkothat egy-egy oligomert vízfázisban. A molekuláris szintű betekintést azonban nehezítette mind az IR, mind a CD spektrumok esetén, hogy heterokirális aciklusos  $\beta$ -peptidekről minimális információ állt rendelkezésre az irodalomban, ami alapján még a másodlagos szerkezet megítélése sem volt lehetséges. A kísérleti méréseket azonban atomi szintű betekintéssel nem tudtuk alátámasztani többszöri próbálkozás után sem NMR vagy krisztallográfiai módszerekkel, ami a rendszerek méret és dinamikus karaktere alapján várható is volt. Éppen ezért MD szimulációkra támaszkodtam, miután sikerült a  $\beta$ -peptidjeinkre megfelelő paramétereket és a szekvenciák tervezését segítő Pymol plugin-t fejleszteniünk (Wacha et al. 2019; Wacha and Beke-Somfai 2021). Az MD szimulációk kimutatták, hogy az 5-ös peptid képes oktamer szerkezeteket felvenni, még hozzá például olyan módon, hogy két tetramer helyezkedik el egymással szemben és közrefogja a hidrofób leucinokat. A tetramereken belül a molekulák között a redőzött rétegre jellemző hidrogénkötések figyelhetők meg, ám a két oldalt nem kapcsolja össze hidrogén kötés (37. ábra). Az egyes monomerek a korábban (Pohl et al. 2012) meghatározott cikk-cakk (zig-zag) téralkatot veszik fel (38. ábra).



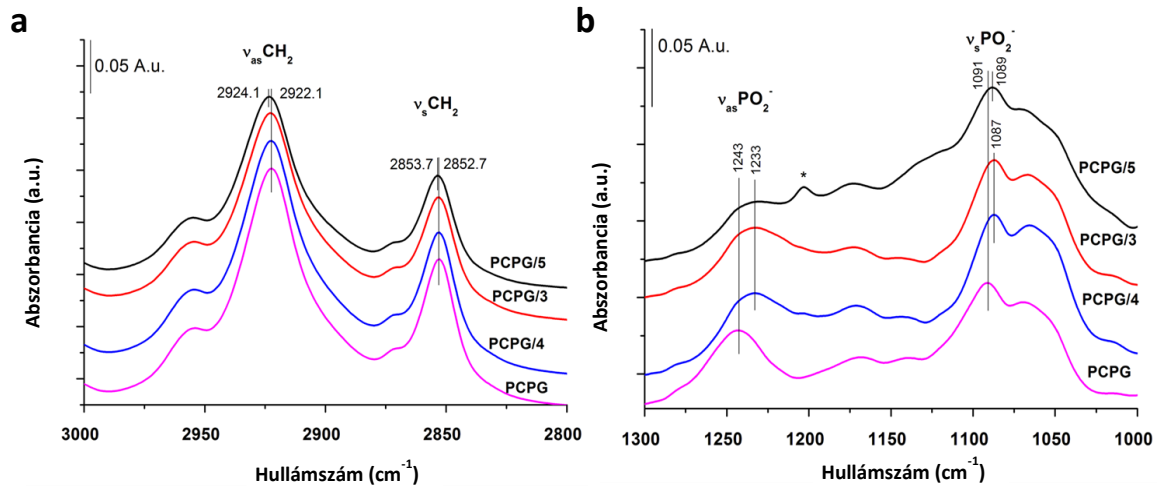
37. ábra. Az 5-ös peptid spontán önszerveződése vízben oktamer oligomerekké, MD szimulációk során. a) Az oligomer felülnézete; b.) előlnézete; c.) oldalnézet melyen azonosítható a két tetramer réteg (Színkód: szén – zöld, nitrogén – kék, oxigén – piros) d.) A girációs sugár és a hidrogénkötések számának időbeli alakulása.



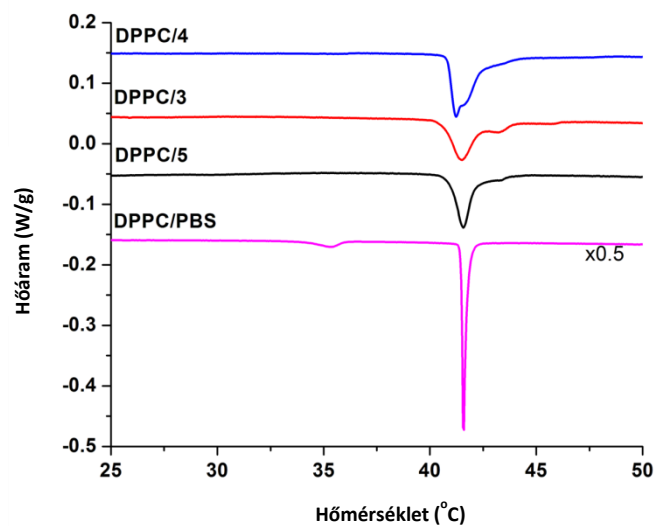
38. ábra. A két fő típusú nyújtott szerkezetű  $\beta$ -peptidlánc, melyek stabil energiaminimumok elméleti számítások során többszálú rendszerekben. A poláris (felül) és apoláris (alul) szerkezeteken a karbonil csoportok dipolusmomentuma félkövér nyilakkal ábrázolva.

A vízdoldható 3, 4 és 5-ös peptidek esetén membránaktivitásukat is vizsgáltuk a kitzűzött célok mentén. Az IR spektrumok, valamint a DSC mérések eredményei egyaránt rávilágítottak, hogy a peptidek jelenléte egyértelműen megváltoztatja a lipid kettősréteg fázisváltásához kapcsolható átmeneteket, ami arra utalt, hogy a peptidek hozzákapcsolódnak a membránhoz

(39. ábra és 40. ábra). Ezen felül az IR spektrumok alapján azt is meg tudtuk állapítani, hogy a DOPC/DOPG típusú kettősrétegben a fejcsoport régióval mind a három peptid kapcsolatba kerül, azonban az acilcsoportokhoz tartozó metilén csoportok ( $\nu_{as}CH_2$ ) eltolódása alapján csak az 5-ös peptid esetén valószínű a membránba történő ágyazódás. Ehhez további részletek az IR spektrum amid régiójából azt mutatják, hogy a beágyazódás során a peptidek között intermolekuláris hidrogénhidak is jelen vannak.



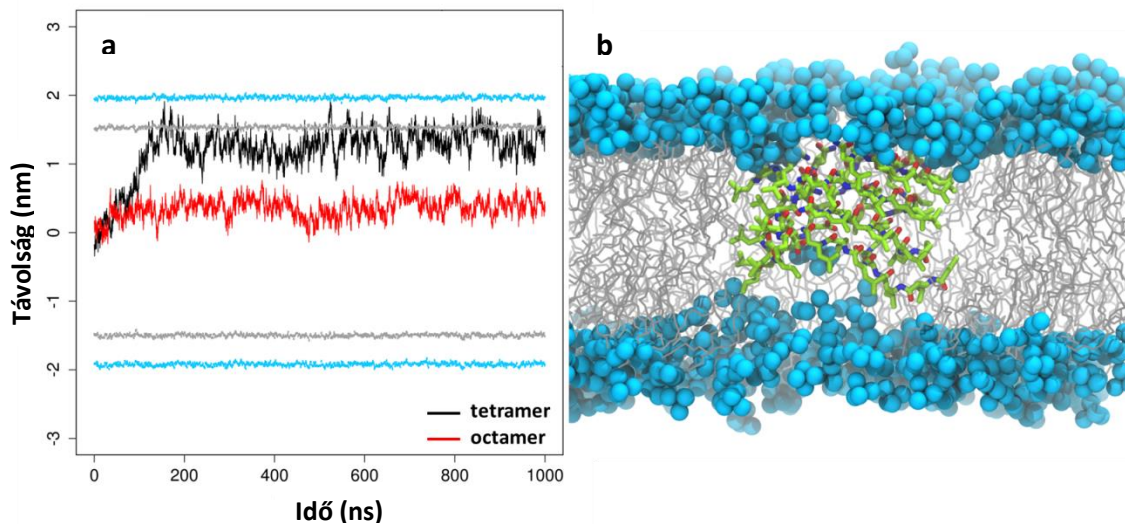
39. ábra. 3-5-ös peptidek DOPC/DOPG IR spektrumainak részletei liposzómák jelenlétében. A zsírsavlánc régió metilén rezgései (a), valamint a foszfát nyújtási rezgései (b) alapján mind a három peptid kötődik a fejcsoport régióhoz, de csak az 5-ös peptid ágyazódik be az acilláncok közé.



40. ábra. DSC termográfok DPPC és DPPC/peptid (3-5) rendszerek esetén PBS pufferben.

A membrán jelenlétében történt kísérleti eredmények értelmezéséhez szintén végeztünk MD szimulációkat, lipid kettősréteg jelenlétében. Ezekben a szimulációkban olyan modelleket építettünk az IR és DSC adatok alapján, melyek lehetőleg intermolekuláris H-hidat

tartalmazzak, és a peptid a lipid láncok közé ágyazva stabilizálódik. Ennek tesztelésére három modellt építettünk, melyben mind a három esetben a peptid(eket) a lipid kettősréteg közepébe ültettük a szimuláció kezdetekor. Az elsőben egy monomer 3K-t, a másodikban a fenti oktamer egyik tetramer rétegét, míg a harmadikban az oktamert helyeztük a membrán közepére, ám az oktamert „kifordítva”, vagyis a hidrofób oldalláncokat kifelé, a hidrofíl oldalláncokat viszont befelé tettük a lipofil környezetbe (2. ábra). Ez utóbbi kifordulás a rétegek közötti H-hidak hiánya miatt könnyebben elképzelhető egy új környezet hatására. Az eredmények azt mutatták, hogy a monomer, illetve a tetramer a szimulációk során elhagyták a lipid kettősréteget és annak fejcsoport régiójában lokalizálódtak. Ezzel szemben a kifordított oktamer oligomer stabilan megőrizte kezdeti pozícióját a lipid kettősréteg közepén.



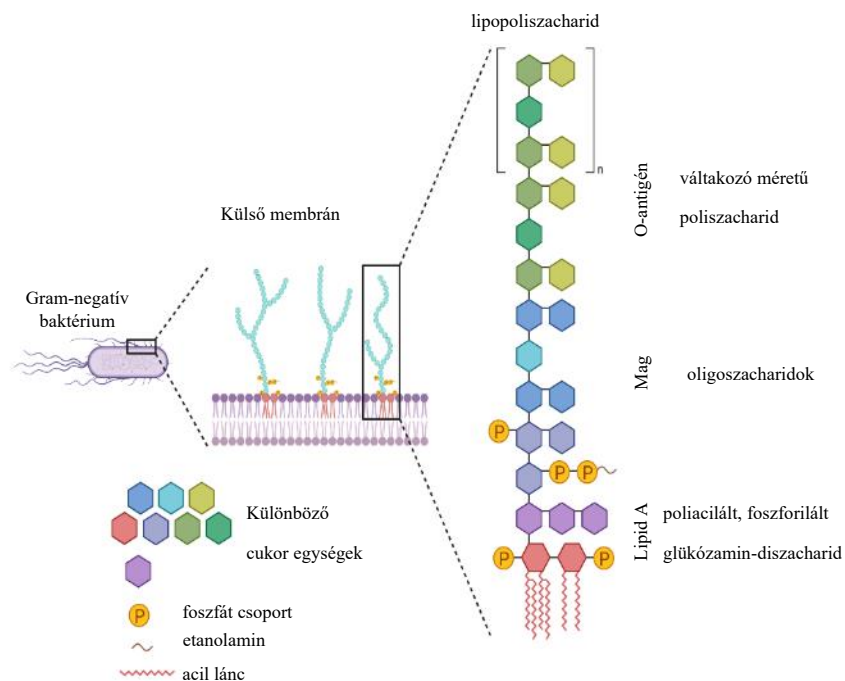
**41. ábra** Az 5-ös foldamer és oligomerjeinek mélységi eloszlása DOPC lipid kettősrétegben MD szimulációk alapján. a) A tetramer és az oktamer formák távolsága a kettősréteg tömegközéppontjához viszonyítva. b) MD szimulációs pillanatkép az 5-ös oktamer membránba ágyazódásáról (Színkód: foszforatomok világoskék, acilláncok szürke, peptidek szén – zöld, nitrogén – kék, oxigén – piros.)

Összességében minden alternáló kiralitással tervezett  $\beta$ -peptidünk membránaktivitást mutatott, és a kiválasztott 5-ös peptid önrendeződése kis méretű oligomereket eredményezett, melyek akár képesek lehetnek membránba ágyazódva is megmaradni oligomer formában. Ugyanakkor érdemes megemlíteni, hogy ezen rendszerek megértése kezdeti stádiumban van, valószínűsíthető, hogy önrendeződésük, membránba ágyazódásuk mechanizmusa további fontos részleteket rejt, melyekhez specifikusabb kérdéseket kell még feltennünk és vizsgálnunk.

Lamellin  $\beta$ -peptidek környezetérzékeny asszociációja (D10)

„Kamal (ext. 851): Hi, could you come up to the 4th? We checked again the *E.coli* TEM images, I think we found something... Eh c'est bon, it was Vignesh who spotted it to be honest.”

Az előző részben bemutatott dinamikus rendszer egyik kulcsfontosságú tulajdonsága volt, hogy a nyújtott szerkezetű peptidlánc mentén az oldalláncok váltakozó irányban foglaltak helyet, az alternáló kiralitású aminosavak miatt. Ezt alapul véve fejlesztettük tovább a szekvenciákat olyan módon, hogy azok lehetőség szerint antimikrobiális hatással is rendelkezzenek. Ennek megfelelően terveztünk olyan  $\beta$ -peptideket, melyekben több pozitív töltés található, és így azok negatívan töltött molekulák jelenlétében képesek konformációváltásra és potenciális szupramolekuláris rendszerek kiépítésére. A pozitív töltésű szekvenciák így érzékenyebbé válhattak pl. foszfát-csoportok jelenlétére. Ez azért előnyös, mert foszfátok nagy számban vannak jelen a gram-negatív baktériumok külső membránjának felszínén, a lipopoliszacharidok lipid A régiójában (42. ábra).

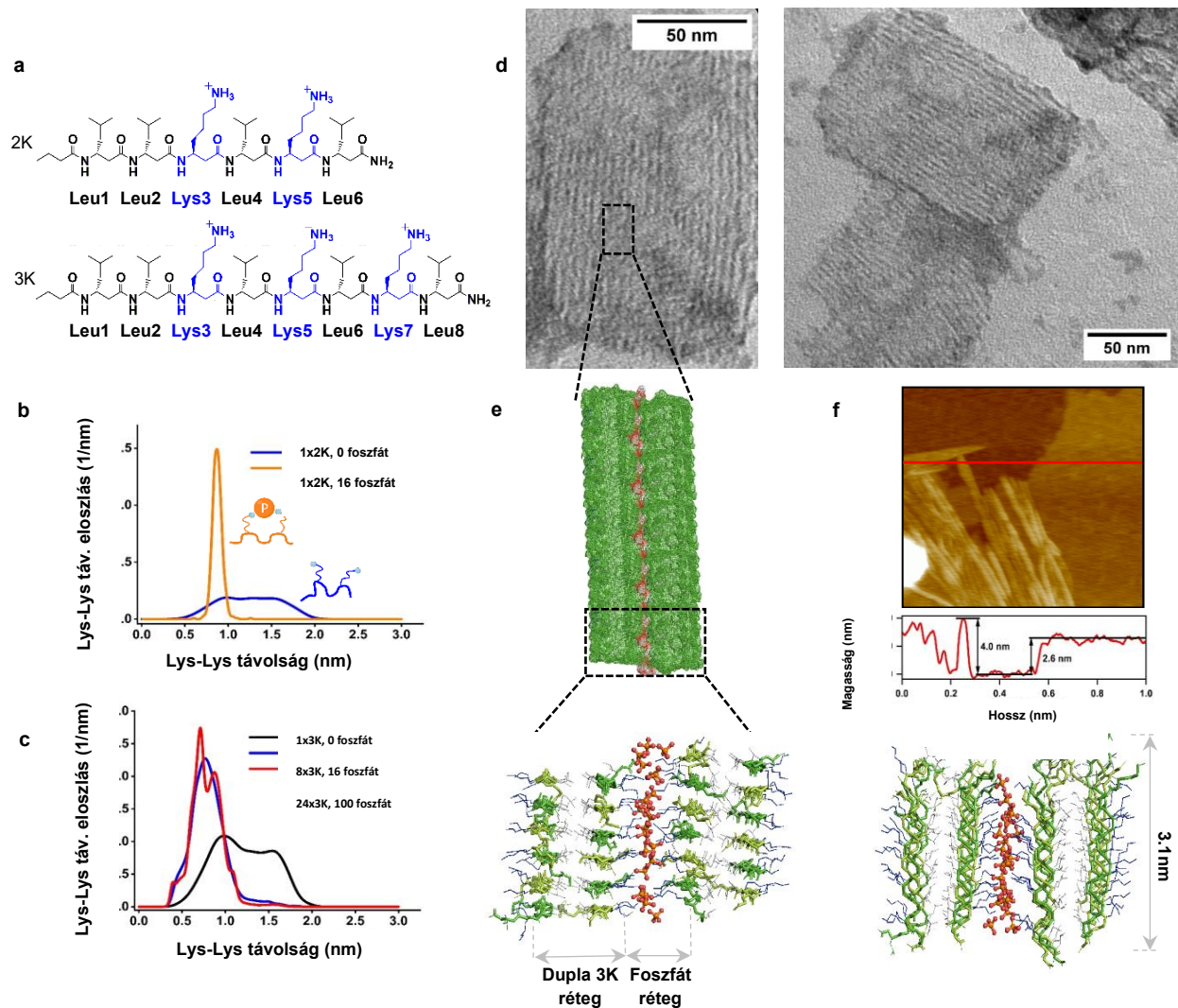


42. ábra. A Gram-negatív baktériumok külső membránjában található LPS molekulák felépítése.

Először a foszfátok által indukált szerveződések kialakulását teszteltük MD szimulációkkal, lizin oldalláncban gazdag hat-, valamint nyolc aminosavból álló analógokon (43. ábra),

amelyeket lamellin-2K és lamellin-3K (vagy 2K és 3K röviden) neveztünk el. Mivel egyetlen foszfát-ion több lizint is képes koordinálni, ezért olyan molekulát próbáltunk kialakítani, amelyben a lizinek megfelelő távolságban vannak egymástól, és a molekula kezdetben véletlenszerű konformációban van, de kölcsönhatásba léphet a foszfátokkal, és rendezette válhat. A vízben végzett szimulációk mind a 2K, mind a 3K esetében előnyben részesítették a véletlenszerű rendezetlen konformációt a pozitív töltésű oldalláncok taszítása miatt (43. ábra. b, c). További szimulációkban a foszfátok jelenlétében a lizin oldallánc  $\text{NH}_3^+$  csoportjainak relatív helyzete lokalizálódott, mivel leggyakrabban két szomszédos aminocsoport egyetlen foszfátot koordinált. Következő lépésként teszteltük a 3K monomerek oligomerizációját foszfátionok jelenlétében. A szimulációk azt mutatták, hogy a foszfátokhoz való többszörös kötődés ismét kialakította a korábban már megfigyelt zig-zag konformációt (Szigyártó et al. 2020), amely itt végül egy 3K-foszfát asszociátum kialakulásához vezetett. A legnagyobb tetrakozamer (24 peptidet tartalmazó) modellek esetén a szimulációk stabil, párhuzamosan orientált lamellin-3K „dupla peptid vektorok” kialakulását mutatták. Ezeket a szerkezet hossz tengelye mentén H-kötések stabilizálták, valamint a döntően leucin oldalláncokból álló hidrofób mag is erősítette (43. ábra. d). A peptid egységeket egy réteg foszfátion kötötte össze, amelyek koordinálták a lizineket. A zig-zag lamellin-3K molekulák körülbelül 3,1 nm széles szupramolekuláris lamellákat adnak, melyekben a dupla peptid vektor és a hidrofób lizin-foszfát régiók szélessége rendre  $\sim 1,8$  nm és  $\sim 1$  nm.

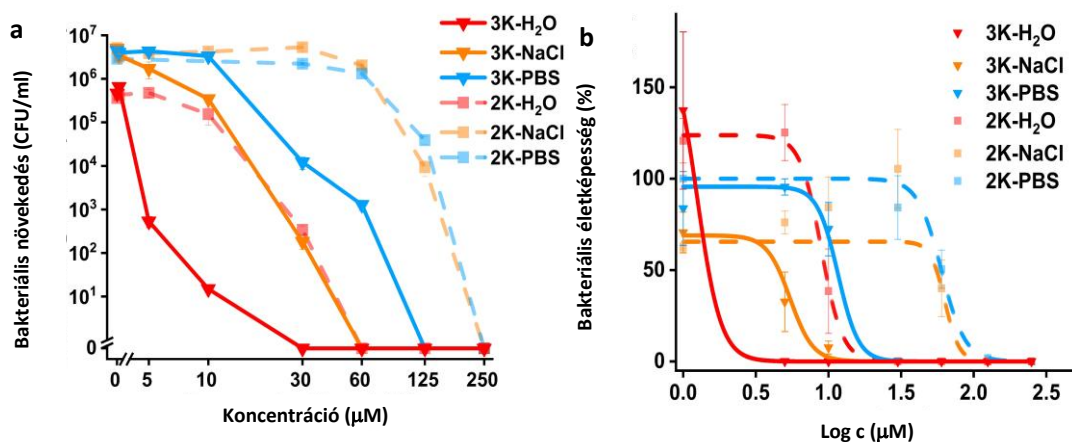
A két fenti molekula kísérleti jellemzése során megerősítést nyert, hogy a foszfát egységek elősegítik a rendezettebb szerkezet kialakulását, összhangban az MD eredményekkel. Az NMR spektroszkópiás adatok azt sugallták, hogy mind a 2K, mind a 3K rendezetlen konformációban van vizes fázisban, azonban a foszfát ionok hozzáadása csökkentette mindkét vegyület oldhatóságát, magasabb rendeződésű rendszerek kialakulására utalva. A morfológiákat sikerült azonosítani TEM, cryo-TEM, AFM és SAXS módszerekkel, amelyből arra jutottunk, hogy a foszfátok jelenlétében a két peptid „csíkos” mintázatú lamellás rendszereket formál, mely mintázat alapvető méretei nagyon közel vannak az MD szimuláció során megfigyeltékhez.



43. ábra. A 2K és a 3K szerkezete, asszociációs mechanizmusa és morfológiája. a) Szekvenciák. b-c) A 2K és a 3K oldallánc nitrogén atomjainak átlagos távolságeloszlása MD szimulációkban foszfátionok jelenlétében vagy hiányában. d) 3K-foszfát lamelláris morfológiák (TEM). e) MD pillanatképek a 3K-foszfát szerveződésekről és sematikus hálós ábrázolás a 3K-foszfát (vagy 3K-PBS) által kialakítható dupla-vektor réteg elrendeződéséről. Peptidgerinc zöld, lizin és leucin oldalláncok rendre kék és szürke. A foszfátionokban az oxigének pirosak, a foszforok narancssárgák. f) 3K-foszfát AFM képe és metszetmagassági profilja.

Megvizsgáltuk, hogy az új szekvenciák rendelkeznek-e antibakteriális hatással. Növekedésgátlást vizsgáló esszék segítségével megállapítottuk, hogy mindkét vegyület erős antibakteriális aktivitást mutatott Gram negatív *E. coli* baktériumok ellen különböző tesztelt közegekben. A 3K hatékonyabb volt, mint a 2K (44. ábra). Érdekes módon a 3K a legmagasabb antibakteriális aktivitást foszfátmentes, tiszta vizes közegben mutatta, az  $IC_{50}$

értéke AMP-khez képest alacsony, 1,24  $\mu\text{M}$  volt (6. táblázat). A 3K hozzáadása után az antibakteriális hatás azonnal észlelhető volt.



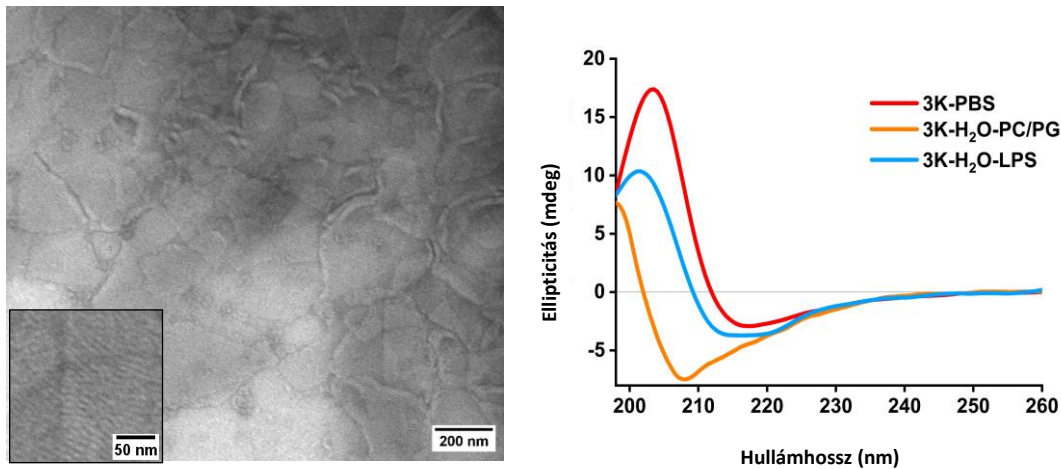
44. ábra. A 2K és 3K antibakteriális hatása különböző közegekben. a) Bakteriális növekedés esszék b) Bakteriális életképesség vizsgálatok

6. táblázat. 2K és 3K antibakteriális hatékonysága *E.coli* baktériumon mérve, különböző közegekben

Anyag	Közeg	IC <sub>80</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	IC <sub>20</sub> [ $\mu\text{M}$ ]
2K	Víz	11,2 $\pm$ 0,373	8,91 $\pm$ 0,364	7,06 $\pm$ 0,343
	PBS	77,7 $\pm$ 3,93	59,8 $\pm$ 3,62	46,1 $\pm$ 4,07
	NaCl	74,2 $\pm$ 10,8	63,3 $\pm$ 11,6	54,0 $\pm$ 12,2
3K	Víz	1,62 $\pm$ 5,6 E-4	1,24 $\pm$ 5,0 E-4	0,957 $\pm$ 4,35 E-4
	PBS	14,6 $\pm$ 1,46	11,6 $\pm$ 1,48	9,27 $\pm$ 1,45
	NaCl	7,00 $\pm$ 1,02	5,44 $\pm$ 0,91	4,22 $\pm$ 0,82

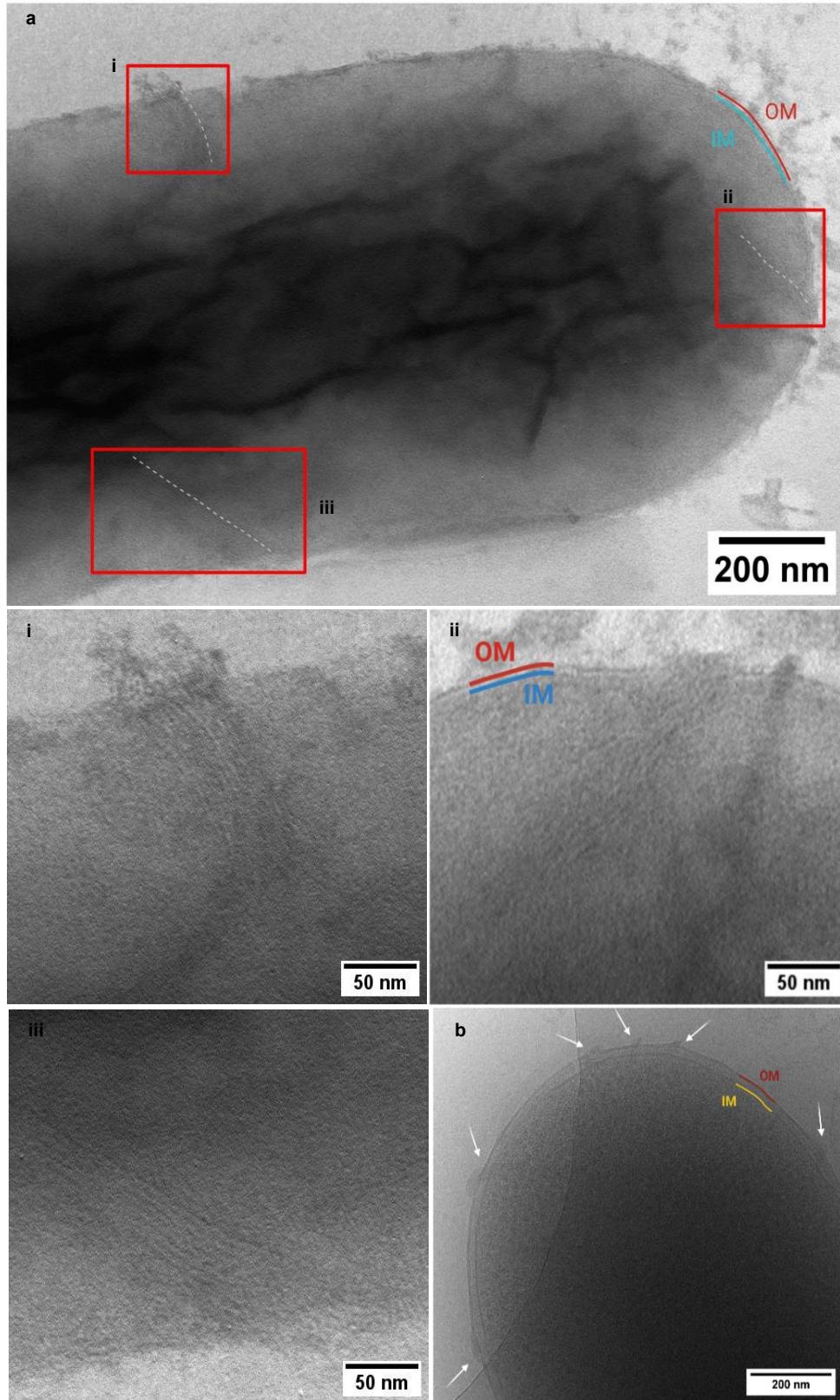
Mivel PBS-ben már azonosítottuk a szupramolekuláris lamellák kialakulását, ezért ebben a közegben az antibakteriális hatásért nagy valószínűséggel ezen asszociátumok felelnek. Ehhez képest foszfátok hiányában elképzelhető volt az is, hogy pl. monomerek fejtik ki az antibakteriális hatást. Alternatívaként az eredetileg tervezett kölcsönhatás, nevezetesen a lipid A régió foszfátjaival kiváltható kölcsönhatás és az azt követő szupramolekuláris antibiotikum kialakulása állhat a baktericid hatás mögött. Hogy megvizsgáljuk, képes-e a 3K bakteriális membránkomponensek jelenlétében asszociátumokat alkotni, vizsgáltuk a peptidet olyan vezikulákkal, amelyek bakteriális és emlős lipidekből állnak, valamint olyan extracelluláris vezikulákkal is, amelyek bonyolultabb összetétellel rendelkeznek. A fő hangsúly a lipopoliszacharidokon (LPS) volt, amely összetett makromolekulák a már említett legfőbb sejtalkotói a Gram-negatív baktériumok külső membránjában a külső rétegnek (42. ábra). Ennek lipid A része gazdag foszfátcsoportokban, és a baktérium sejtfalának külső

membránfelszínén található. A lamellin-3K LPS-sel történő reakciójában tiszta vizes oldatban a TEM képeken ugyanazokat a szupramolekuláris csíkozott mintázatokat figyeltük meg, mint 3K-PBS esetén keletkező asszociátumoknál (45. ábra).



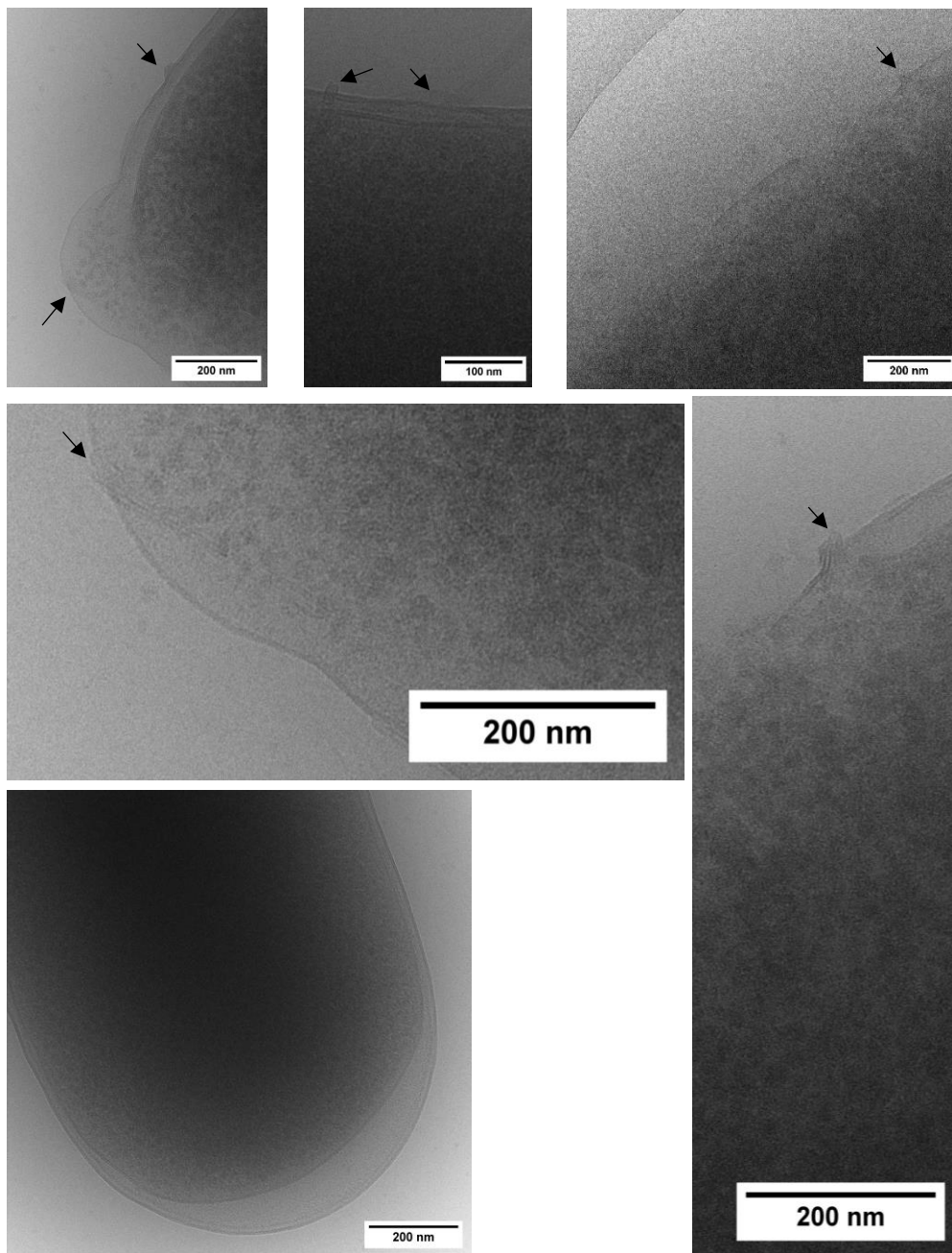
45. ábra. 3K-LPS rendszer vizsgálata. (Bal) A 3K-LPS csíkozott mintázatának kialakulása (TEM). (Jobb) A 3K-LPS tiszta vizes oldatának és a lamellákat tartalmazó 3K-PBS hasonló CD spektrumai.

Annak azonosítására, hogy vajon a baktériumok felszínén is kialakul-e egy hasonló szupramolekuláris rendszer -mely a toxicitásért felelős mechanizmus kulcseleme lehet-, a baktériumokat vizes közegben tartva 3K-t adtunk az oldathoz, majd a mintákat mind TEM-mel, mind pedig krio-EM-mel is megvizsgáltuk. A vizes, foszfátmentes közeg azért volt szükséges, mert így az oldatban nem indulhatott el spontán a 3K és foszfátionok által képzett asszociátumok kiépülése. A magas felbontású képeken egyértelműen kirajzolódtak a lamellák a baktériumokban, nagyjából hasonló felépítéssel, mint a lamellin-3K esetében PBS-ben (46. ábra). A krio-EM vizsgálatok membránroncsolást mutattak a lamelláris morfológiák mentén. Mindkét módszerrel azt láthattuk, hogy a szupramolekulák kialakulása a külső membrán (OM) felülete közeléből indult, és azok átütve a belső membránt (IM) mélyen a sejten belülré nőttek. A lamellák helyén az OM és az IM határok elmosódtak, ami arra utalt, hogy a kialakult asszociátumok bemetszik a sejtfalat, lehetővé téve a sejten belüli folyadék kiszivárgását (47. ábra). A lamellák kialakulása nagyon nagy valószínűséggel a sejtfelszíni lipid A régióból indulhatott, majd annak növekedését a baktériumon belül található foszfátok táplálták tovább.



46. ábra. Bakteriális vizsgálatok TEM és krio-EM képei, puffermentes vizes közegben 3K-val. a. i-iii E. coli TEM képe és annak nagyításai. b. krio-EM kép ugyanarról a rendszerről. OM: külső membrán; IM: belső membrán

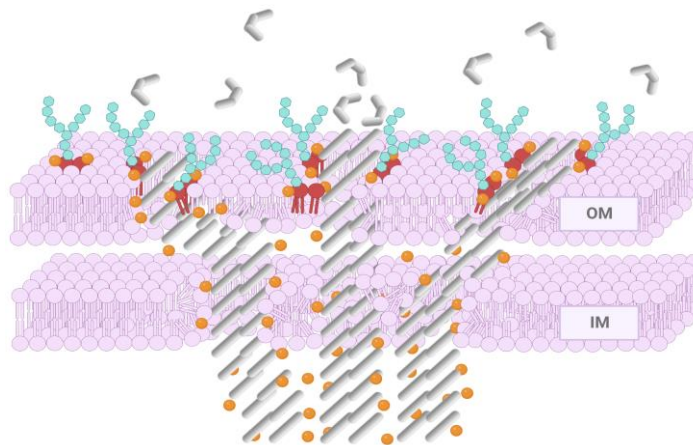
A fentebb részletezett MD modellek és a 3K foszfát EM képek alapján megbecsülhető, hogy hány molekula alkotja a baktérium belsejébe jutó szupramolekuláris asszociátumokat. Ennek megfelelően, valamint az azonosított baktériumban levő lamellák méretei alapján átlagosan a lamellákban kb.  $\sim 10300 \pm 2500$  3K molekula található. Továbbá, csak kb.  $\sim 5-20$  lamellát figyelünk meg azokban a sejtekben, amelyekben jelentős intracelluláris folyadékszivárgás van, így azt becsüljük, hogy kb.  $\sim 5 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^5$  3K molekula szupramolekuláris lamellin formában elegendő lehet egyetlen baktérium elpusztításához. Hasonló természetes membránaktív vegyületek esetében ugyanezen a hatás eléréséhez legalább egy



47. ábra. Krio-EM képek az E.coli baktériumon 3K lamellák által okozott roncsoló hatásról. (bal alul) Intakt E. coli referenciaképe

nagyságrenddel több molekulára van szükség (Melo et al. 2009), ami azt mutatja, hogy a jelenleg spontán módon kialakuló asszociátum nagyon hatékony a bakteriumon mutatott toxikus aktivitás kifejtésében. Azért megjegyzendő, hogy noha a különböző kísérletekből és szimulációkból származó kapott adatok minőségileg alátámasztják a fenti egyszerűsített számításokat, a krio-EM és oldatfázisban végzett AFM mérések során a lamellák mérete általában hosszabb és szélességre vékonyabb volt, mint amit a TEM képek alapján azonosítottunk, ami csökkentheti a fenti számolás pontosságát. További részletekbe menő tanulmányok szükségesek sejtes kísérletekkel és például az egyedi molekuláris formák egyensúlyi állapotokra is koncentrálva ahhoz, hogy egy pontosabb mennyiségi betekintést kapjunk.

Az itt bemutatott szupramolekuláris morfológiák egyedülállónak tekinthetők a nem-természetes  $\beta$ -peptidekből felépülő rendszerek között. A kombinált MD, NMR és EM eredmények nyújtott zig-zag konformációra és abból egy redőzött réteghez hasonló szerkezetet felvevő rendszerre utaltak, amelyek az aciklikus  $\beta$ -peptidek esetében egy ritka konformációt jelentenek. Általánosabban tekintve ezek a lamellák hasonlóságot mutatnak néhány olyan szupramolekuláris rendszerrel, amelyet egyszerűsített membránmodelleken természetes peptid alapú antibiotikumok esetén a közelmúltban azonosítottak (Shukla et al. 2022). Az itt kapott bakteriális sejtekből nyert mikroszkópos betekintés és a kifejlesztett – viszonylag egyszerű- lamellin rendszer, mely a célsejt membránján található egységekkel való kölcsönhatástól indukálva képes belenőni a sejtbe jelenleg egyedi eredménynek tekinthetőek (48. ábra). Remélhetőleg ez előrelendíti majd a természetes antimikrobiális mechanizmusokkal kapcsolatos átfogó megértésünket is, valamint a hasonlóan tervezett konformációváltozással járó szupramolekuláris antibiotikumok megjelenését. Ezek



48. ábra. A 3K lamellin rendszerek Gram-negatív membránba történő "belenövésének" sematikus ábrája. LPS cukorrégiója világoskék, lipid A régió piros, foszfátok narancs, a konformációváltozáson áteső 3K-k szürke.

makroszkopikus természetüknek köszönhetően jelentős kárt okozhatnak a baktériumok membránjain, ami koncepcionálisan új, alternatív megoldást hozhat az antimikrobiális rezisztencia (AMR) elleni harcban is. Posztulátumként állítom, hogy a természet rendszeresen kihasználja ezt a technikát, és hasonló asszociátumok már régóta jelen lehetnek a gazdaszervezetek immunrendszerének arzenáljában más szupramolekuláris védelmi elemekhez hasonlóan, azonban tranziens voltuk miatt jelenleg még nem sikerült őket azonosítanunk.

## Triazol foldamerek kezdeti vizsgálata

*„Johann: -Hej, jag har något här nu, jag tänkte om at klicka två aminosyra tillsammans med Ru ÅÅ. Vad tycker du om detta?*

*-T: Jaha, det skulle vara kul, men tyvärr har jag ingen aning om hur man syntetisera de. Låter ganska snygg ändå...*

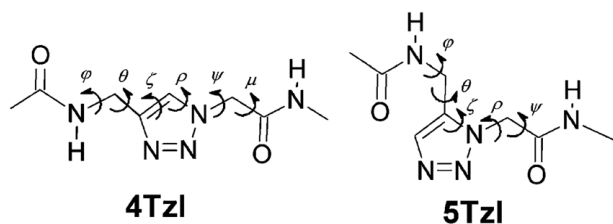
*J: Haa, Låt mig prata med Nina, kanske we ska se vad kunde vi göra för det.,,*

A peptidnukleinsavak, majd az azt hamarosan követő  $\beta$ -aminosavak és  $\beta$ -peptidek kezdeti megjelenése után gombamód kerültek közlésre változatos szerkezetű és tulajdonságú aminosavakból felépülő peptidrendszerek. Idevágóan a klikk-kémia térhódításával felmerült, hogy a rézkatalizált reakció segítségével összekapcsolható egy karbonsav és egy aminosav csoport védett származéka, ilyen módon egy aminosavat eredményezve. Ez az aminosav egy triazol pentaciklust tartalmaz az aminosavgerincben, melyen 1,4 pozíciójú a két funkcióscsoport ezáltal egy merev, nyújtott konformációt kölcsönözve a molekulának (4Tzl, vagy 1,4-Tzl). Ezzel a különleges aminosavval az ebből felépíthető homooligomer peptidek koncepciója is felmerült (Diness et al. 2017). Ehhez képest, a ruténiummal katalizált azid-alkil ciklodaddícióval hasonló funkcióscsoportok összekapcsolása 1,5 pozíciót eredményez, mely aminosavak általánosságban inkább egy U alakú preferált téralkatot eredményeznek (5Tzl, vagy 1,5-Tzl), ám ebből foldamer oligopeptid elérésére nem láttunk kísérletet. Megjegyzendő, hogy ezen különleges aminosavakat számos területen felhasználhatjuk, akár egy darab  $\alpha$ -aminosavat cserélve egy természetes szekvenciában, akár azonos 5Tzl-eket, vagy 4Tzl-eket egymás után kapcsolva triazol peptid oligomerekként alkalmazva. Előbbinek és utóbbinak is széleskörű alkalmazása lehet, hiszen a gyűrűt tartalmazó rendszerek segítségével kikényszeríthetünk kívánt szerkezeteket, esetleg elkerülhetünk a tervezés során nem kívánt kölcsönhatásokat, ezért a hasonló aminosavegységek a szintetikus biotechnológia hasznos eszközei. A két említett triazol aminosav, illetve a belőlük felépíthető peptid foldamerek szerkezeti tulajdonságait azonban nem ismerjük részletesen. Az alábbi alfejezetek ezen két alapvető aminosav építőegységek térszerkezetének, valamint az 5Tzl-ből felépülő peptid foldamerek szerkezeti tulajdonságainak feltérképezésére tesznek kísérletet.

Alapvető szerkezeti elemek, triazol aminosavak szerkezeti tulajdonságai (D11)

A peptid foldamerek terén nemrégiben új típusú rendszerekként jelentek meg az 1,4- és 1,5-szubsztituált triazol aminosavakat tartalmazó foldamerek. Ezekhez az oligomereket alkotó aminosavak könnyen előállíthatók a Cu- és Ru-katalizált klikk reakciókkal, és növelt oldallánc

variációt kínálhatnak. Fontos azonban, hogy a kérdéses aminosavak szerkezeti képességeit még nem vizsgálták részletekbe menően. Ennek megfelelően a mostani rész alapjául szolgáló tanulmányban elméleti vizsgálatokat végeztem a két legfontosabb alapegység, az 1,4-szubsztituált (4Tzl) és a 1,5-szubsztituált (5Tzl) 1,2,3-triazol aminosavak konformációs terével kapcsolatban, kvantumkémiai számítások, majd NMR spektroszkópia felhasználásával (49. ábra).



49. ábra Triazol aminosavak konstitúciója és fontosabb torziós szögek definiálása

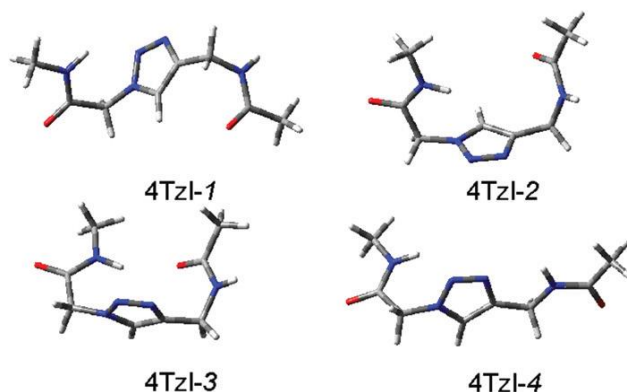
A 4Tzl potenciális energia-hiperfelületének (PEHS) szisztematikus feltérképezéséből az RHF/3-21G szintű szerkezetoptimalások összesen 12 megkülönböztethető konformert eredményeztek (a konformációs enantiomereket nem számítva). A magasabb szintű számítások oldószerek jelenlétében a stabil konformerek számát négyre csökkentették (7. táblázat és 50. ábra).

7. táblázat. A stabil minimumként azonosított 4Tzl konformerek relatív energiái. A szerkezetoptimalást vízben, DMSO-ban és dekanolban végeztük, az energiákat pedig B3LYP/6-311++G(2d,2p) és  $\omega$ B97X-D/6-311++G(2d,2p) elméleti szinteken számítottuk ki.

Konformer	Módszer	Relatív Energia (kcal/mol)		
		H <sub>2</sub> O	DMSO	1-Decanol
4Tzl-1	B3LYP	0,00	0,00	0,00
	$\omega$ B97X-D	0,00	0,00	0,00
4Tzl-2	B3LYP	0,01	0,02	0,05
	$\omega$ B97X-D	-0,25	-0,02	0,02
4Tzl-3	B3LYP	-	-	-
	$\omega$ B97X-D	0,30	0,50	0,37
4Tzl-4	B3LYP	0,60	0,61	0,63
	$\omega$ B97X-D	0,80	1,03	1,09

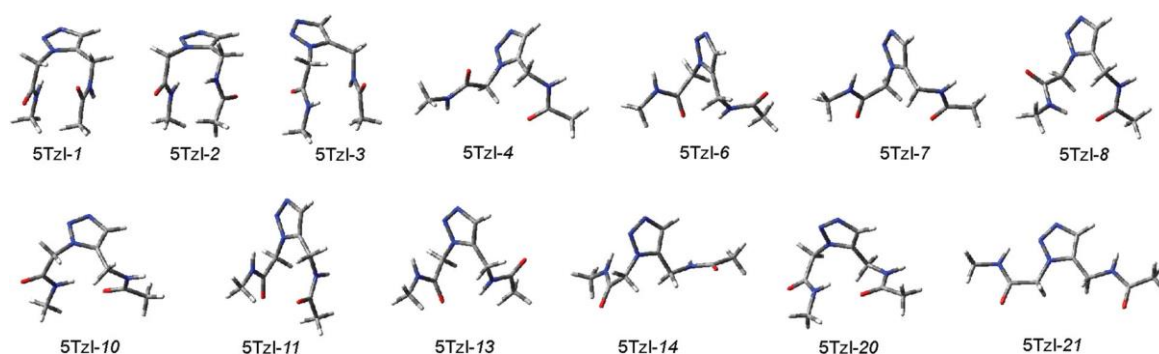
A 4Tzl konformerek szerkezeti tulajdonságai összesen hat diéderes szöggel (torziós szöggel) jellemezhetők (49. ábra). A két középső nem tekinthető szabadon forgónak, mivel azokat az 1,2,3-triazol heterociklus anti pozícióban tartja. A magasabb szintű számításoknál stabilan maradt négy konformáció esetében a szerkezeti tulajdonságok meglehetősen hasonlóak.

Ezeknél a konformációknál az első két diéderes szög *gauche* (*g*) pozícióban van, váltakozó orientációval, azaz *g*<sup>-</sup> és *g*<sup>+</sup>. Az utolsó két diéderes szög pedig eltolódott *gauche* pozícióban van, bár ugyanazzal az orientációval, azaz *g*<sup>+</sup>*g*<sup>+</sup>. Az egyetlen kivétel az a  $\mu$  torziós szög a 4Tzl-3 esetében, amely közel van a nullához. Az 4Tzl-4 konformáció nyújtottabb szerkezettel rendelkezik -az első két torziós szög *anti*- és csak az utolsó két torziós szög van *gauche* pozícióban.



50. ábra. A 4Tzl energia hiperfelületének feltérképezése után, a magasabb elméleti szinten oldószeres fázisban azonosított 4 stabil konformer

A 4Tzl aminosavakhoz képest az 5Tzl konformerek szerkezeti tulajdonságai öt torziós szöggel írhatók le (50. ábra). A középső torziós szög közel nulla fokban rögzített. Az 5Tzl esetében a szisztematikus PEHS-vizsgálat 27 megkülönböztethető konformert eredményezett. A magasabb szintű gázfázisú számolások ezt 13 stabil konformerré redukálták (51. ábra), majd az ezt követő oldószeres közegben történő optimalálás a minimumok számát végül kilencre csökkentette. Ez jóval több, mint a 4Tzl esetén tapasztalt négy darab minimum. A magasabb szintű számítások során stabil konformerek többsége "hajlított" kanyar-szerű konformer, a torziós szögek nagy része *gauche* pozícióban van (51. ábra és 8. táblázat).



51. ábra. A  $\omega$ B97X-D/6-311++G(2d,2p) szintű gázfázisú optimalások során kapott 13 stabil konformere.

**8. táblázat. 5Tzl minimumainak energetikai és szerkezeti tulajdonságai. A kvantumkémiai számítások három különböző oldószermodellben, a B3LYP/6-311++G(2d,2p), az  $\omega$ B97X-D/6-311++G(2d,2p) és az RMP2-FC/6-311+G(d,p) elméleti szinteken történtek**

Konformer	Másodlagos szerkezet <sup>a</sup>	Módszer	Relatív energia (kcal/mol)			Energia szint
			H <sub>2</sub> O	DMSO	Decanol	
		B3LYP	0,00	0,00	0,00	
5Tzl-1	H14	$\omega$ B97X-D	0,00	0,00	0,00	<b>ALACSONY</b>
		MP2	0,00	0,00	-	
		B3LYP	-1,65	-1,64	-1,60	
5Tzl-2	C8	$\omega$ B97X-D	0,42	0,36	-0,19	<b>ALACSONY</b>
		MP2	0,94	0,95	-	
		B3LYP	-0,65	-0,63	0,14	
5Tzl-3	Turn1	$\omega$ B97X-D	-0,14	-0,10	0,19	<b>ALACSONY</b>
		MP2	0,23	0,22	-	
		B3LYP	-0,56	-0,55	-0,48	
5Tzl-4	2-Helix	$\omega$ B97X-D	1,51	1,48	1,43	<b>KÖZEPES</b>
		MP2	1,27	1,27	-	
		B3LYP	1,32	1,30	0,42	
5Tzl-6	H8	$\omega$ B97X-D	2,77	2,70	2,35	<b>MAGAS</b>
		MP2	1,88	1,85	-	
	Spiral /	B3LYP	-0,20	-0,18	-0,07	
5Tzl-7	H16	$\omega$ B97X-D	1,51	1,47	1,53	<b>KÖZEPES</b>
		MP2	1,62	1,60	-	
		B3LYP	-1,04	-1,01	-0,81	
5Tzl-8	H10	$\omega$ B97X-D	-0,23	-0,25	-0,02	<b>ALACSONY</b>
		MP2	0,21	0,21	-	
	H10 /	B3LYP	-0,70	-0,69	-0,50	
5Tzl-10	Turn2 /	$\omega$ B97X-D	-0,08	-0,11	-0,06	<b>ALACSONY</b>
	Turn3	MP2	0,29	0,29	-	
		B3LYP	0,25	0,29	0,37	
5Tzl-14	Spiral	$\omega$ B97X-D	2,24	2,28	2,49	<b>MAGAS</b>
		MP2	1,62	1,60	-	

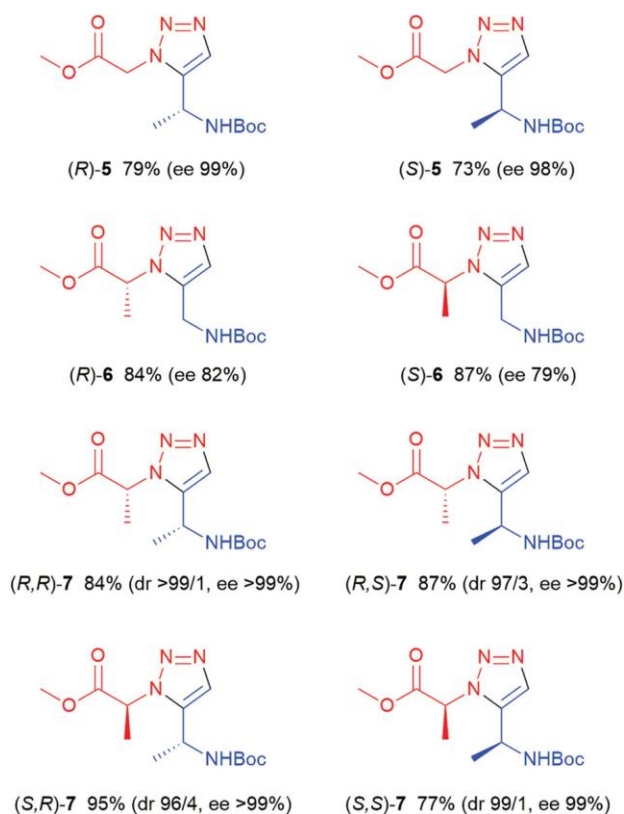
<sup>a</sup>A potenciális másodlagos szerkezet, amely az adott konformer segítségével elméletileg felépíthető, részletekért *lásd*.

Az 5Tzl és 4Tzl aminosavak között jelentős különbség, hogy az 5Tzl esetében jóval több stabil konformer azonosítható. Ugyanakkor ezek esetében jóval nehezebb elméleti számítások alapján egyértelmű energetikai sorrendet felállítani, mivel ezen konformerek energetikailag közel állnak egymáshoz, és az alkalmazott elméleti megközelítés függvényében az 5Tzl konformerek relatív stabilitása változik (8. táblázat). Ide kapcsolódóan Johan Johansson és Nina Kann kollegáim a 4Tzl és 5Tzl BOC-védett változatait is előállították, majd ezek konformációit 2D NOESY NMR segítségével elemeztük és kísérletet tettünk az elméleti

számításokkal való összehasonlításra. Az elméleti eredmények 9 konformert mutatnak az 5Tzl esetén, ahol ezek relatív energiái egymáshoz közel helyezkednek el, ami nagy szerkezeti sokféleséget eredményezhet. Az NMR-analízis is azt jelzi, hogy a spirál, hélix és kanyar (Turn) típusú másodlagos szerkezeti elemekhez vezető konformerek együtt lehetnek jelen oldatfázisban. Ezzel szemben a 4Tzl esetében az NMR vizsgálatok alapján hiányoznak az erős intrareziduális kölcsönhatások és a rendszer rendezetlen oldat fázisban. Ez jól illeszkedik a négy talált nyújtott konformerrel, illetve azok alacsony relatív energiakülönbségével.

Subsztituált 5Tzl aminosavak és azok szerkezeti preferenciája (D12)

A 1,4- és 1,5-diszubsztituált triazol aminosav monomerek esetén változatos oldalláncokat kapcsolhatnánk össze klikk reakció segítségével, mely esetén akár 8-féle kiralitású diszubsztituált Tzl-t kaphatunk. Ugyanakkor a királis mono- vagy diszubsztituált triazol aminosavak szintézise és szerkezeti tulajdonságai csak részlegesen lettek megvizsgálva, az elméletileg elérhető összes aminosavhoz vezető szintetikus lépések, valamint azok szerkezeti preferenciái nem kerültek feltérképezésre. Ebben a részben a nyolc elméletileg elérhető királis triazol származék szerkezeti tulajdonságait részletezem, amelyeket Johan Johansson, Nina Kann és Anna-Said Ståhlsdemel kollegák erőfeszítéseinek eredményeképpen sikerült ruthénium-katalizált azid-alkin cikloaddícióval (RuAAC) előállítani is (52. ábra). Az egyes építőelemek konformációs tulajdonságainak értékelésére a monomereken ismét egy szisztematikus kvantumkémiai tanulmányt végeztem, amely az energetikai minimumok tulajdonságait célozta meghatározni.

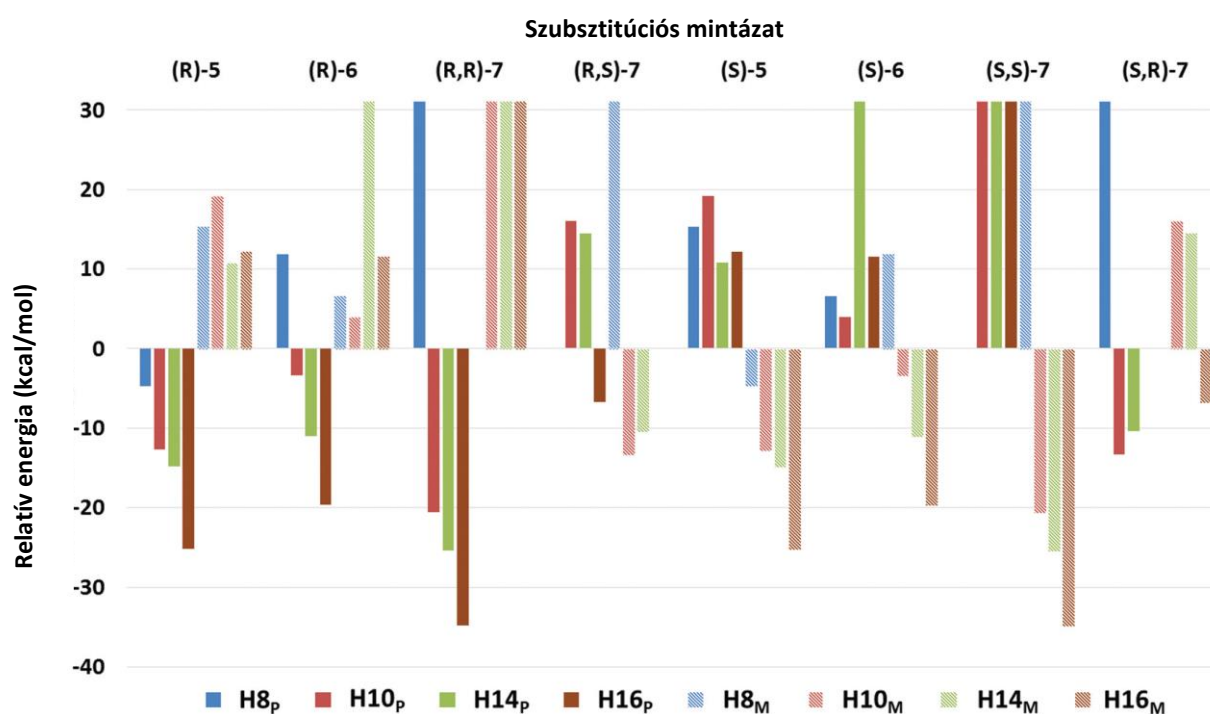


52. ábra. Az elméletileg kapható 8 5Tzl diszubsztituált aminosav, és azok szintetikus úton elért tisztasága illetve termelési hatékonysága

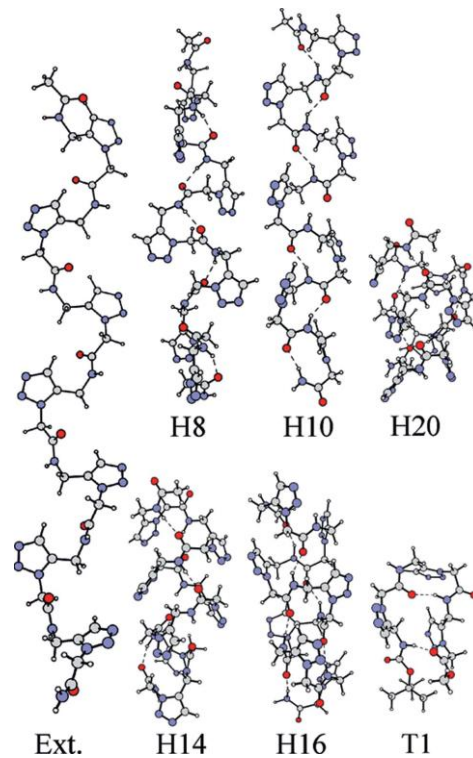
A szintetikus munkával sikerült igazolni, hogy minden oldallánc-variáció elérhető. Ezek után figyelmünket a vegyületek konformációs tulajdonságaira irányítottuk. Ehhez ismét kvantumkémiai számításokat alkalmaztam, három különböző elméleti szinten. Itt a korábban megtalált 20 akirális konformerből indultunk ki a nyolc királis modell elkészítéséhez, amelyek az Ac-5Tzl-NHMe általános szerkezetet követték (Ac = acetil, NHMe = N-metil). Megjegyzendő, hogy az *R*- és *S*-konformerek enantiomerpárok képeznek, ezért csak az aszimmetrikus potenciális energia-hiperfelület (PEHS) egyik oldalának relatív energiáit számoltuk ki minden modell esetén, viszont az eredményeket az enantiomerpárokra vonatkozóan taglaltuk, az alacsony energiájú minimumokra fókuszálva. Az eredményekről elmondható, hogy az (*R*)-5 és (*S*)-5 modellek esetében, 18 illetve 17 konformert azonosítottunk, és ezekből rendre 9 illetve 7 relatív energiája 3 kcal/mol, vagy annál kisebb. Ez arra utal, hogy elvben mindkét származéknak több mint tíz stabil konformere lehet és így több alacsony energia szintű másodlagos szerkezet építőegységül szolgálhatnak. A (*R*)-6 és az (*S*)-6 esetében 6 illetve 11 alacsony relatív energia szintű konformert találtunk. Ezen monosubsztituált triazol modellek hasonlítanak abban az akirális triazol származékra, hogy ismét számos

alacsony energia szintű másodlagos szerkezet volt azonosítható. Ezzel szemben az  $(R,R)$ -7 és  $(S,S)$ -7 enantiomerpárnál csak 3 és 5 alacsony energia szintű konformert találtunk. Az  $(R,S)$ -7 és az  $(S,R)$ -7 esetében 3 illetve 7 alacsony energia szintű konformer található. A diszubsztituált modellek alacsonyabb számú stabil konformerének valószínűleg szterikus okai vannak.

Összefoglalásul elmondható, hogy az összes lehetséges királis kombináció előállítható az 1,5-diszubsztituált 1,2,3-triazol egységek esetén a rutenium-katalizált azid-alkin cikloaddíció (RuAAC) segítségével, közepes és jó hozamokkal. Ezen felül megállapítást nyert, hogy minden királis vegyületnek több alacsony energia szintű konformere van, ami változatos konformációs sokféleséget eredményezhetne, ha homo-oligomereket szintetizálnánk ezekből a monomerekből.



53. ábra. A 8 lehetséges diszubsztituált 5Tzl-ből álló heptamer homooligomer peptidek másodlagos szerkezeti elemeinek relatív szabadentalpia értékei vízben ( $\omega$ B97X-D/6-31+G(d,p)// $\omega$ B97X-D/6-31G(d)). Referencia az 5Tzl-ből felépült összes másodlagos szerkezet szabadentalpiájának átlaga.



54. ábra. 5Tzl heptamerek elméletileg elérhető másodlagos szerkezetei

Hosszabb triazol foldamerek, egyszerűbb asszociátumok (D12, D13, D14)

A fenti monomereken elvégzett számítások alapján próbáltuk azt megbecsülni, hogy az egyes oldalláncok hogyan befolyásolhatják a triazol peptidek másodlagos szerkezeteinek energiasorrendjét. Mivel a szintézissel előállított metil oldalláncú aminosavakból nagyon nehéz lenne hosszabb peptideket előállítani a hidrofób oldalláncok miatt, ezért a vizsgálatokat csak elméleti számításokra korlátoztuk, és azon belül heptamer peptidek összesen 8 szerkezeti elemére koncentráltunk (53. ábra, 54. ábra). Tekintettel a legtöbb aminosav esetén kapott kanyar alakú stabil minimumokra, elsősorban különféle hélixek relatív energiáit vizsgáltuk. Az egyes helikális szerkezeteket úgy neveztük el, hogy a hélixek nevét a peptidláncon belül hidrogénkötések által összekapcsolt atomok számát adja (e.g. H8, H10, H14 és H16). Ezen hélixek vizsgálatát elvégeztük mind jobbra (*P*) mind balra forgató (*M*) szerkezetek esetén és figyelembe vettük a víz, mint oldószer hatását is. Ekkor az (R)-6, (R)-5 és (R,R)-7 aminosavakból álló heptamerek esetén a legstabilabb másodlagos szerkezet a jobbmenetes H16 konformáció, H16P volt (53. ábra és (Stålsmeden et al. 2020)). Itt a második legstabilabb konformáció a H14P volt. Hasonlóan, az (S)-6, (S)-5 és (S,S)-7 esetében H16M a legstabilabb. Ezeknél a vegyületeknél a fent említett H16 konformációk magas relatív stabilitással

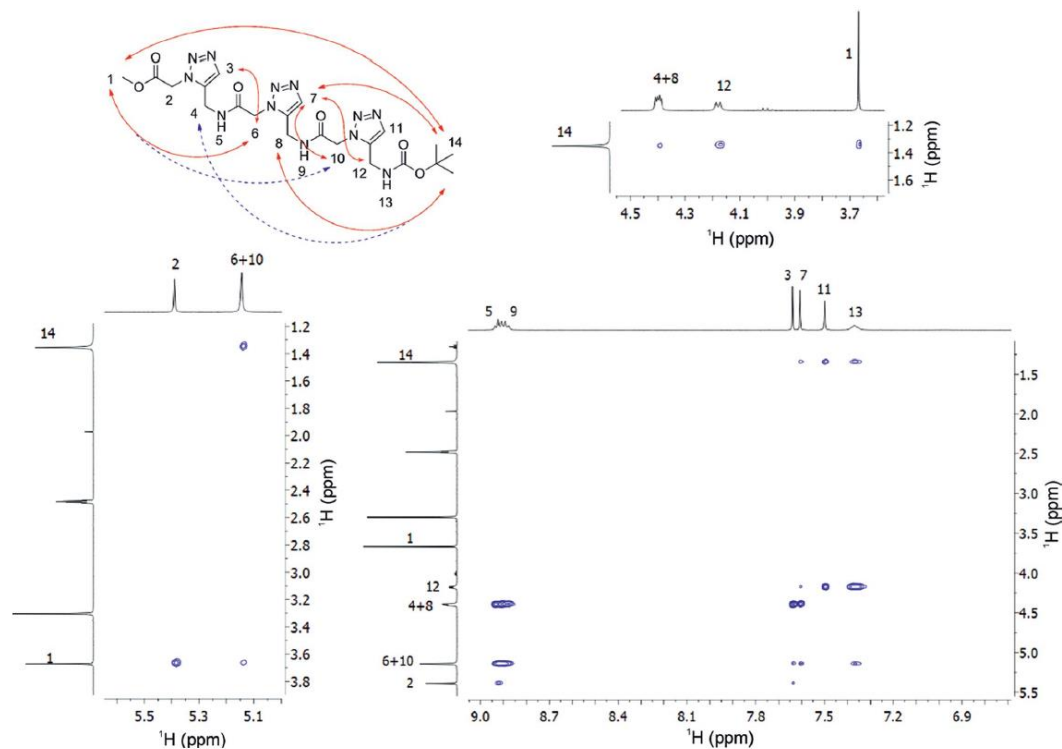
rendelkeznek az általunk vizsgált másodlagos szerkezetekhez képest, mivel energiájuk majdnem 9 kcal/mol-al alacsonyabb, mint a második legstabilabb a H14 hélixé. Ehhez képest az (*R*)-5 és (*R,R*)-7 aminosavak heptamerjei esetén a H10P a H14P relatív energiái nagyon közel vannak egymáshoz.

Ellentétben az előző hat oldallánc szubsztitúciós mintával, szerkezeti szempontból az (*S,R*)-7 és (*R,S*)-7 monomerek felhasználásával épített oligomerek tűnnek a legérdekesebbnek. E két oligomer esetében az általunk vizsgált konformerek relatív energiája sokkal közelebbi értékekkel rendelkezik egymáshoz képest. Az (*R,S*)-7 esetében a legstabilabb konformer a H10M, azonban annak relatív energiája csak ~3 kcal/mol-al különbözik a második legstabilabb konformer H14M-től. Ráadásul a harmadik legstabilabb konformer a H16P, amely ellentétes kéziségű (balmenetes), mint az előbbi két konformer, mégis az energiája mindössze 7 kcal/mol-al tér el a H10M-től. Hasonlóan a (*S,R*)-7 esetében is megfigyelhető ugyanez az energiasorrend. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az (*S,R*)-7 és (*R,S*)-7 rendszerek esetében valószínűleg olyan szterikus tényező jelenik meg, amely a különböző másodlagos szerkezeteket hasonló stabilitásúvá teszi. Ez valószínűleg olyan konformációs sokféleséget eredményez, amely hasonló az élő rendszerekben megfigyelt természetes peptid vegyületekéhez. Vegyük figyelembe, hogy homooligomerek esetén az előbbi eredmények ellentétben állnak a monomerek esetében megfigyelt konformációs sokféleséggel. Amint a monoszubsztituált Tzl aminosavak oligomerizálódnak, világossá válik, hogy az általunk vizsgált másodlagos szerkezetek közül az egyikre van egyértelmű előny. Ez az észrevétel érvényes azonos királis kettős szubsztituált vegyületekre is, mint például az (*S,S*)-7 és az (*R,R*)-7. Ellentétben az előzőekkel, a vegyes szubsztitúciós minták, mint például az (*S,R*)-7 és a (*R,S*)-7, konformációs sokféleséget eredményezhetnek homooligomerek esetében, mivel több másodlagos szerkezeti elemnek van közel azonos relatív energiája, függetlenül attól, hogy jobb-, vagy balmenetesek.

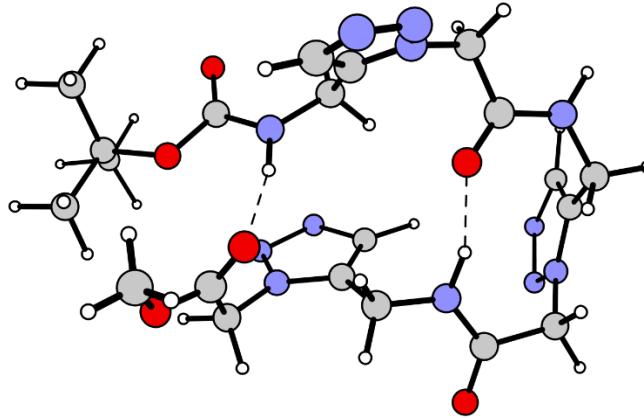
Érdekes, hogy a váltott (*R* és *S*) királis rendszerek esetén a vizsgált helikális szerkezetek közül több relatív energiája is közel esik egymáshoz, mely kiindulópontja lehet egy változatos szerkezeteket felvenni képes peptidrendszernek. Összességében azt várjuk, hogy a jövőben az 1,5-diszubsztituált 1,2,3-triazol vázra építve új foldamer osztályok tervezése és szintézise is megvalósulhat a jelen bemutatott eredmények alapján.

A monomerek kísérleti előállítását követően dimer, trimer és tetramer szerkezetek kialakítása és kísérletes szerkezetvizsgálata is fontos szempont volt. Ezért az akirális 5Tzl építőelem felhasználásával oligomereket szintetizáltunk, melyek lehetővé teszik a peptidomimetikumok gerincjellemzőinek vizsgálatát. Az NMR-spektroszkópiás adatokat kombinálva a számított

másodlagos szerkezetekkel, a tri- és tetra-oligomerek Boc- és metilészter-védőcsoportokkal ellátott NMR-spektrumai arra utalnak, hogy a tetramer szerkezete nem kényszeríti az oligomert egyetlen preferált konformációba, inkább ezek az oligomerek egyszerre több helikális és hajlított konformert foglalnak el (55. ábra, 56. ábra). A több stabil konformer jelenléte nemcsak a megfigyelt NOE-k által, hanem az azt támogató számítási módszerekkel kapott relatív energiaszétosztások által is alátámasztott. A számított relatív energiák figyelembevételével a trimer ill. a tetramer valószínűleg H16-ot, egy hajlított konformert, vagy akár H20-as hélixhez szükséges téralkatot is alkothat. Az akirális oligomerek esetén az ilyen konformációs flexibilitás előnyös tulajdonság, mivel azt jelzi, hogy a gerinc szerkezete elég rugalmas, ami elvezethet a szerkezeti sokféleséghez a későbbi szekvenciális módosítások során.

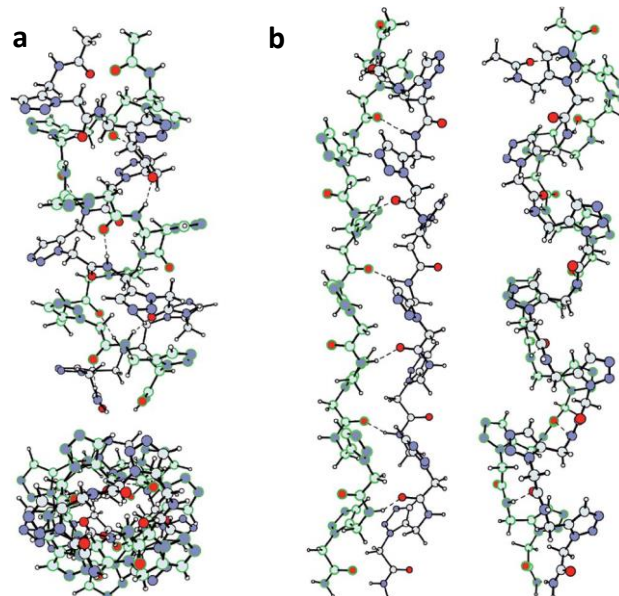


55. ábra. Az 5Tzl trimer DMSO-ban felvett  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spektrumának fontosabb részletei, amelyek az inter-resziduális NOE keresztcsúcsokat mutatják, beleértve az  $^1\text{H}$  NMR spektrumot. Piros nyilak: azonosított NOE-kért felelős atompárok, szaggatott kék vonalak: átfedő kémiai eltolódások, valószínűsíthető alternatív atompárok. További részletekért lásd Johansson et al. 2014.



56. ábra. Boc-5Tzl trimer kanyar konformációban

A fenti rendszereken túl vizsgáltuk elméleti módszerekkel, hogy milyen típusú magasabb rendezettségű asszociátumok lehetnének elérhetőek ezen vegyületek számára. Ehhez két dupla szálú szerkezetet optimalizáltam, ezzel tesztelve, hogy vajon a vegyületek szerkezeti, konformációs és energiabeli tulajdonságai lehetővé teszik-e a magasabb rendű struktúrák kialakulását. Az egyik szerkezet egy összefonódott dupla hélixben hasonló volt az antimikrobiális csatornaképző gramicidinéhez (2-Helix) (Wallace 2000). A másik pedig egy párhuzamos lemez (Sheet), analógja a természetes peptid- és fehérjeszerkezetekben megfigyelt párhuzamos  $\beta$ -redőzött rétegnek (57. ábra).



57. ábra. A heptamer 5Tzl model elméleti úton vizsgált többszálás modelljei. a) Egy két szálból álló hélix (2-Helix) oldal- és felülnézetben. b) Párhuzamos redőzött réteg (Sheet) kétféle oldalnézete

Ezen több százból álló rendszerek esetén kapott relatív energiák  $-7,7$  kcal/mol voltak a 2-Helix és  $-2,2$  kcal/mol a Sheet modell esetén a referencia H14-es hélix monomeréhez képest, az  $\omega$ B97X-D/6-31+G(d,p)// $\omega$ B97X-D/6-31G(d) szintű elméleti számolás szerint. Ezek az értékek arra engednek következtetni, hogy az ilyen asszociátumok hasonló stabilitással rendelkezhetnek, mint az egyetlen százból kialakuló alacsony energiájú hélikális szerkezetek. A kvantummechanikai számítások alapján a megfelelő oldalláncok és környezet kiválasztásával az 5Tzl oligomerekből magasabb rendű önszerveződő szerkezetek jöhetnek létre. Fontos megjegyezni, hogy ezek a kezdeti kvantummechanikai tanulmányok nem tudnak figyelembe venni több olyan entropikus tagot, amelyeknek jelentősek hatása lehet a valós rendszer szabadentalpiájának meghatározásához. Ezen felül hosszútávon a bemutatott kezdeti törekvéseken túli kísérleti vizsgálatok is szükségesek ezen rendszerek teljesebb megértéséhez. Figyelembe véve a fent említett tulajdonságokat a 5Tzl oligomerekkel kapcsolatban, valamint hogy a ruténiummal katalizált klikk reakció könnyű hozzáférést biztosít számos aminosav-származékhoz, azt várjuk, hogy ezek az új klikk oligomerek vagy "clickomerek" értékes kiegészítést jelentenek a meglévő peptid foldamerekhez, és kiváló molekuláris vázát nyújtanak a szerkezet-funkció kapcsolatok vizsgálatához, bonyolultabb szekvenciák alkalmazásával. A szakirodalomban több tanulmány megtalálható, ahol egy 5Tzl aminosav szekvenciába illesztésével sikerült kívánatos szerkezetváltozást – és ehhez kapcsolódó kedvező funkcióváltást- tapasztalni. A több 4Tzlből és 5Tzl-ből álló oligomerek és hosszabb inzerciók egyre gyakrabban megjelenéséhez azonban még több kihívás vár a területre. Természetesen a különféle szerkezetek megismeréséhez és feltérképezéséhez MD szimulációk elvégzése alapvető fontosságú lesz a jövőben. Ezzel kapcsolatban elmondható, hogy az általunk azonosított szerkezeteket is felhasználva a közelmúltban N. Sewald és I. Antes csoportjai elvégezték a 4Tzl és 5Tzl aminosavak erőterre történő parametrizációját az Amber erőtermodellhez (Marion et al. 2018), mely így már lehetőséget teremt bonyolultabb Tzl-tartalmú szerkezetek explicit oldószeres vizsgálatára is. Itt a szerzők kiemelték, hogy az általunk definiált legalacsonyabb 4 konformerből három egyezik számolásaikkal a 4Tzl esetén (4Tzl-2, 4Tzl-1, valamint explicit oldószerben 4Tzl-4). Ezen felül az 5Tzl konformerek esetén ugyanazt a szerkezeti sokféleséget és torziós szögekkel is hasonlóan jellemzett belső hidrogén híd kialakításokat azonosították, mint mi a kvantumkémiaili számolások során. A QM és MD tanulmányok abban is egyezést mutattak, hogy az 5Tzl esetén a konformációk relatív stabilitása érzékeny az alkalmazott oldószerre. Összességében tehát elmondható, hogy az általunk elvégzett kezdeti szerkezetvizsgálatok hasznos alapjai további kiterjesztett tanulmányoknak, valamint új, fontos technikáknál szükséges módszerfejlesztéseknek.

Összevetve a kezdeti  $\beta$ -peptidek szerkezeteinek és asszociátumainak feltérképezésével, megállapítható, hogy ugyanazon a vonalon a korai, egyszerűbb asszociátumok szerkezeti tulajdonságaiig értünk itt el, amihez funkcionális, orvosi biológiailag jelentős hatás még nem mutatható fel. Jelentős különbség azonban a  $\beta$ -peptideknél tett erőfeszítéseinkhez képest, hogy itt a szintetikus kollegáknak köszönhetően a szerkezeti tulajdonságokon felül az összes 5Tzl előállítás lépései is megoldottak és elérhetőek. Érdekes azt is szem előtt tartani, hogy a relatív magas elméleti szintű QM konformációs analízis – noha erős dinamikai és méretbeli határokkal rendelkezik- meglepően jól képes előrejelezni a bonyolultabb rendszerek által bejárható konformációs teret, és ezáltal már egy kezdeti betekintés során is hosszútávra megalapozott eredményeket adhat.

## Összefoglalás és kitekintés

---

Az eredmények alapján sikerült a peptidek szerveződése kapcsán általános érvényű következtetéseket tenni, elindítani új területek feltérképezését, valamint speciális példákon gyakorlati példát mutatni az indukálható szerveződés kihasználására az antimikrobiális vegyületek területén. Az eredményekhez kapcsolódó összefoglalást a téziseim köré szerkesztve a dolgozat felépítését követve tématerületenként taglalom az alábbiakban.

### TERMÉSZETES PEPTIDEK INDUKÁLHATÓ MAGASABB SZINTŰ SZERVEZŐDÉSEI

#### *Két komponensű rendszerek elméleti vizsgálata (D1)*

**I.** Az AMP-k térszerkezetváltozása negatív töltésű szerves kismolekulákkal alkotott komplexképzés során érdekes, mivel: 1. természetes biomolekulák esetében egy ilyen komplexképződés hatással lehet mind az összetevők funkciójára; 2. ezek a kölcsönhatások megjelenhetnek pl. étkezéssel bevitt mesterséges kismolekulákkal is; 3. amennyiben a szerkezet mellett az AMP-k aktivitása is modulálható így, akkor a peptidek akár targetálhatóak lehetnek. Az erős aggregációs hajlam miatt az NMR spektroszkópia, vagy röntgenkrisztallográfia nem bizonyultak alkalmas vizsgálati módszereknek, ezért egy választott két komponensű rendszeren, a CM15 nevű AMP és a poliszulfonált suramin nevű gyógyszermolekula kölcsönhatásán keresztül vizsgáltuk azok asszociátumképzésének kezdeti szakaszát MD szimulációk segítségével. Metadinamikai szimulációkkal megmutattuk, hogy a CM15-suramin esetén a legnépesebb klaszter a rendszer 85,5%-át teszik ki, melyben a CM15 helikális téralkatú. Szabadentalpia számítások segítségével meghatározható volt, hogy a relative erős kötődés a suramin és a példa AMP-ként használt CM15 molekula között jelentős entrópia tagot is tartalmaz. A szimulációk alapján megállapítottam, hogy a suramin valójában inkább stabilizálja a CM15 peptidek populációban meglévő helikális térszerkezetét, semmint indukálja annak kialakulását.

#### *A lizofoszfátidsav hatása peptidszekvenciák térszerkezetére (D2)*

**II.** A fenti térszerkezetváltozást kísérletes módszerekkel történő vizsgálatnak is alávettem. Ehhez több AMP-n vizsgáltuk egy micellaképző lipid jelzőmolekula, a lizofoszfátidsav (LPA) szerkezetet befolyásoló hatását, melyet elsősorban CD spektroszkópiával követtünk. Megállapítottuk, hogy az LPA-val történő kölcsönhatások a vizsgált peptidek esetén többször is olyan másodlagos szerkezeteket eredményeztek, melyeket korábban az adott szekvenciára

még nem azonosítottak. Általánosságban az LPA és peptid kölcsönhatások alátámasztják, hogy az AMPk esetén számos aktív szerkezet és kapcsolt mechanizmus még ismeretlen, és azok valószínűsíthetően túlmutatnak a közvetlen membránon kifejtett toxikus hatáson. Ezen felül, az LPA micellák esetén a peptidekre nézve a következő három kötődéstípust azonosítottuk: 1. Micellába ágyazott kötődés helikális peptidszerkezettel; 2. Helikális szerkezet kötődése az LPA micella felszínére; 3. Az LPA micella felületén kinyújtott,  $\beta$ -szál szerkezetben történő peptid kötődés.

#### *Quorum érzékelő molekulák királis asszociációi (D3)*

**III.** Humán jelzőmolekulák mellett vizsgáltam, hogy az AMP-k képesek-e más hasonló funkciót betöltő molekulákkal is kölcsönhatni. Ezek közül az egyik legérdekesebb a bakteriális biofilmekben levő baktériumok közötti kommunikációért felelős, az ún. quorum sensing (quorum érzékelő, QS) molekulák csoportja. Kiválasztottuk a reprezentatív LL-37 gazdavédő peptidet, valamint a *Pseudomonas aureginosa* kinolon jelző molekuláját (Pseudomonas quinolone signal, PQS), és ezek kölcsönhatását CD spektroszkópiával követtük. A CD és abszorbancia spektrumok felvétele után megállapítottuk, hogy a PQS és az LL-37 interakciójakor egyedi komplexek, majd makroméretű asszociátumok alakulnak ki, melyek a CD spektrumokban indukált CD jelek megjelenését okozzák. A megfigyelhető indukált CD jelek pozíciói megegyeztek az akirális PQS molekula főbb abszorpciós csúcaival, ami arra utal, hogy a királis peptiddel rendezett asszociátumok keletkezése indukálhatja a CD jeleket. Az PQS-sel történő komplexképzés eredményeivel rámutattunk arra, hogy a gazdavédő peptidek diverz potenciális védekezési módjai lehetnek mikrobiális fertőzések esetén.

#### *AMP-k asszociátumai endogén vegyületekkel (D4)*

**IV.** További lépésként 9 AMP-t – köztük több természetes gazdavédő peptidet- választottam ki, hogy megvizsgáljuk hemin- illetve biliverdinnel esetleges kölcsönhatásukat, a kialakuló magasabb rendű asszociációkat, valamint ezen kölcsönhatások potenciális biológiai jelentőségét. A CD spektrumokon változások voltak azonosíthatóak melyek alapján megállapítottuk, hogy a hemin jelenléte már 1:1 arányban is jelentős helikális feltekerődéssel jár a legtöbb vizsgált peptid esetében. Ezen felül TEM segítségével azonosítottunk kiterjedt, részlegesen rendezett aggregátum morfológiákat több peptid esetén. A fentiek biológiai relevanciáját sejtes esszékkel teszteltük. Ezek egyértelműen kimutatták, hogy az LL-37 citotoxikus hatását jelentősen csökkenti a hemin jelenléte. Ezzel feltehetőleg az

immunrendszer képes lehet modulálni a túlexpresszált AMP-k saját sejtekre káros hatását, ezáltal kontrollálni a külső fertőzésekre történő immunválaszt. Másik oldalról viszont - tekintettel az esetlegesen magas hemin koncentráció szintén toxikus hatására- az eredmények a peptidok hem-kötő tulajdonságát is hangsúlyozzák. Összességében megállapítottuk, hogy a hemin és metabolitjainak kötődése erősen preferált a vizsgált AMP-k esetében, mely alapvetően hozzájárul annak a korábban rögzült szemlélet átértelmezéséhez, hogy az AMP-k funkciója kimerül az ellenséges mikrobiális membrán roncsolásában.

#### *Három komponensű rendszerek kialakulásának szimulációs és kísérletes vizsgálata (D5, D6)*

V. Vizsgáltuk MD szimulációkkal és kísérletes módszerekkel is CM15-suramin molekulával alkotott komplexét lipid kettősrétegek jelenlétében. A CD, DLS és MD vizsgálatok eredményei egymással összhangban nyújtottak betekintést egy dinamikus rendszerbe, ahol a peptid kölcsönhatása a lipid kettős réteggel és a suramin molekulákkal versengő módon alakul, amelyben a peptid-suramin arány, valamint több más tényező is befolyásolja az egyensúly kialakulását. Megállapítottam, hogy a CM15-suramin komplex vízben könnyen nagy aggregátumot alkothat, azonban PC kettősréteg jelenlétében ezek kisebbek lesznek, néhány egyedi peptid pedig belép a fejcsoport régióba. További megállapítás, hogy a negatívan töltött PC/PG rendszer esetében a CM15-suramin asszociátumok nem is épülnek fel igazán, inkább a kis kezdeti komplexek "beleoldódnak" a kettősréteg felszíni régióiba. Az elméleti és a kísérleti eredmények összhangban voltak egymással.

#### *Biológiai aktivitás és mögöttes mechanizmus (D7)*

VI. Megvizsgáltam, hogy lehetséges-e valamely AMP antibakteriális hatását növelni szerves kismolekulákkal történő asszociátum képzéssel. Ehhez néhány anionos élelmiszer-adalék, pl. a tartrazin (TZ), és egy nyálból származtatott AMP (DHVAR4) kölcsönhatását és közös aktivitását tanulmányoztuk. Ez a kölcsönhatás jelentősen növelte az antibakteriális hatást mind Gram-pozitív (*S. pneumoniae*), mind Gram-negatív (*E. coli*) baktériumokra nézve, míg emlős sejtekre nézve nem tapasztaltuk a toxicitás növekedését.

Megállapítottuk, hogy az AMP aktivitás pozitívan módosítható ételfesték molekulák által. Ezen felül azonosítottuk, hogy a növelt aktivitás mechanisztikus háttere a DHVAR4-TZ komplexek membrán kölcsönhatásához kapcsolódik, ahol a peptid növekvő helikális jellegét a TZ hatásának köszönheti, amelynek eredményeként AMP-foszfolipid hidrogén kötések jönnek létre. Ezek megzavarják a kettősréteg integritását és szabályozott blebképződéshez

vezetnek a célsejtek membránján. A kevert antibakteriális összetevőkre megfigyelt szinergikus hatásokkal szemben ez egy alapvetően más mechanizmus, ahol a TZ közvetlenül molekuláris szinten kapcsolódva befolyásolja a membránon található AMP-t elősegítve annak biológiailag aktív helikális konformációját.

## **$\beta$ -PEPTIDEK KOMPLEX ASSZOCIÁTUMAI**

*Membránaktív asszociátumok vázszerkezete - kezdeti elméleti számolások (D8)*

**VII.** Az önszerveződő peptid-alapú mesterséges membránaktív nanorendszerek racionális, alulról-felfelé tervezésének támogatása érdekében kvantumkémiai számítások segítségével hasonlítottam össze a természetes,  $\alpha$ -peptidek, és az aminosavak homológ során következő legegyszerűbb nem természetes, ún.  $\beta$ -peptidek redőzött rétegből felépülő hordószerű csövet alkotó szerveződéseit. Praktikus szempontból közelítve, a természetes fehérjék esetében ez a vázszerkezet alkotja a  $\beta$ -hordó membránfehérjéket. Megállapítottam, hogy a  $\beta$ -peptidek nagyobb affinitást mutatnak a nanocsövek kialakítására, mint a természetes peptidek. A nyitott redőzött réteg szerkezetéhez viszonyítva egy energetikailag stabil nanocső kialakításához hat peptid szükséges  $\alpha$ -peptidek esetében, de már kettő is elég  $\beta$ -peptidek használatakor. Megállapítottam továbbá az energetikai analízisből, hogy az  $\alpha$ -peptidek csőtestének az antiparallel elrendezés a kedvezőbb, míg a  $\beta$ -peptidek esetén a parallel orientáció a preferált.

*Membránaktív rendszerek dinamikus asszociátumai (D9)*

**VIII.** A természetes aminosavakból álló  $\alpha$ -peptidek és természetes fehérjerészletek  $\beta$ -redőzött rétegek kialakításához szükséges egyik legfontosabb tulajdonsága a nem természetes  $\beta$ -peptidekkel szemben az, hogy a nyújtott peptidgerinc mentén az egyes oldalláncok váltakozva helyezkednek el. Ezért, hasonló vázszerkezet előállításához olyan heterokirális rendszereket terveztem, melyeknek hidrofób és hidrofil oldalláncai az alternáló kiralitás miatt váltakozva az ellentétes oldalra kerülnek. Az optimált szekvenciáknál végül módosításokkal azt is sikerült elérni, hogy végtelen és oldhatatlan fibrillumok keletkezzenek. Ezzel sikerült olyan önszerveződő  $\beta$ -peptideket alkotnunk, melyek oligomerizálnak vízben, ám önszerveződésük nem feltétlenül folytatódik végtelen fibrillumok felé. Az öt kérdéses szerkezetből három volt vízoldható, melyek egyben membránaktívak is voltak. Megállapítottuk, hogy a legígéretesebb peptid (**5**) a membrán mélyebb rétegeibe is beágyazódik, és ott intermolekuláris H-kötéseket is kialakít. Ezzel sikerült egy olyan

heterokirális  $\beta$ -peptid szekvenciát előállítani, mely nyújtott konformációban oligomerizálódik, és membránba ágyazódva is valószínűsíthetőleg asszociátumot képez.

#### *Lamellin $\beta$ -peptidek környezetérzékeny asszociációja (D10)*

**IX.** Fentieket figyelembe véve továbbfejlesztettem a heterokirális  $\beta$ -peptid szekvenciákat olyan módon, hogy azok lehetőség szerint antimikrobiális hatással is rendelkezzenek. A tervezett peptidek pozitív töltésűek voltak (2K ill. 3K), és negatív ionok (pl. foszfát ionok) esetén képesek voltak asszociátumok kialakításához kapcsolt konformációváltásra. Megállapítottuk, hogy ezek a peptidek képesek lamelláris morfológiákat felépíteni foszfát csoportok jelenlétében. Kimutattuk, hogy ezek az ún. „lamellinek” erős antimikrobiális hatással rendelkeznek. Spektroszkópai vizsgálatokkal, valamint krio-EM és hagyományos TEM technikákkal sikerült megmutatni, hogy mechanizmus szempontjából a baktériumokon kifejtett toxikus hatásuk valószínűleg annak köszönhető, hogy kötődnek a Gram negatív baktériumok külső membránjában található lipopoliszacharidok foszfátgazdag régióhoz, és azokról elindulva befelé alkotnak lamelláris morfológiákat melyek felvágják a membránt ezzel sejthalált okoznak.

### **TRIAZOL FOLDAMEREK KEZDETI VIZSGÁLATA**

#### *Alapvető szerkezeti elemek, triazol aminosavak szerkezeti tulajdonságai (D11)*

**X.** A peptid foldamerek terén nemrégiben új típusú rendszerekként jelentek meg az 1,4- és 1,5-szubsztituált triazol aminosavakat tartalmazó foldamerek. A jobb tervezhetőségükhöz elméleti vizsgálatokat végeztünk a két legfontosabb alapegység, az 1,4-szubsztituált (4Tzl) és a 1,5-szubsztituált (5Tzl) 1,2,3-triazol aminosavak konformációs terével kapcsolatban, kvantumkémiai számítások és NMR spektroszkópia felhasználásával. Azonosítottam, a két molekula összes stabil konformerét, illetve megállapítottam, hogy az 5Tzl esetében jóval több stabil konformer található. Szintén megállapítottam, hogy utóbbi konformerek energetikailag közel állnak egymáshoz.

#### *Szubsztituált 5Tzl aminosavak és azok szerkezeti preferenciája (D12)*

**XI.** Svéd szerves kémikus kollegákkal sikeresen előállítottuk az elméletileg lehetséges nyolc királis 5Tzl mono- és diszubsztituált származékot ruténium-katalizált azid-alkin cikloaddíció (RuAAC) révén. Az egyes építőelemek konformációs tulajdonságainak értékelésére a monomereken egy szisztematikus kvantumkémiai tanulmányt végeztem, amely az energetikai minimumokat és azok alapvető tulajdonságait célozta meghatározni. Összességében kimutattuk, hogy minden királis szubsztituált vegyületnek több alacsony energiaszintű

konformere van, ami változatos konformációs sokféleséget eredményezhetne, ha homooligomereket szintetizálnánk ezekből.

#### *Hosszabb triazol foldamerek szerkezete és energiája (D12, D13, D14)*

**XII.** Áttekintettük a különböző RuAAC szintézissel előállított aminosavak alkalmazási területeit, melyből világossá vált, hogy meglevő természetes peptidekbe történő egy aminosavas beillesztések mellett a több triazol aminosavat tartalmazó foldamereknek is széleskörű alkalmazhatósága lehet, azonban ezek szerkezeti tulajdonságai kevésbé ismertek. Ezért kvantumkémiai számításokkal vizsgáltam, hogy az egyes oldalláncok hogyan befolyásolhatják a triazol peptidek másodlagos szerkezeteinek energiasorrendjét. Királis és akirális építőelemekből felépített egyszálú heptamer peptidek esetén összesen 8 szerkezeti elemre koncentráltam. Megállapítottam, hogy királis aminosavak esetén a vegyes szubsztituációs minták, mint például az *(S,R)*-7 és az *(R,S)*-7, konformációs sokféleséget eredményezhetnek homooligomerek esetében, mivel több másodlagos szerkezeti elemnek van közel azonos relatív energiája, függetlenül attól, hogy jobb-, vagy balmenetesek. Számolások mellett akirális építőelemekből előállítottunk homooligomereket és azok szerkezetét NMR-spektroszkópiával is vizsgáltuk. Ezek eredményét kombinálva a számított másodlagos szerkezetekkel, a tetra-oligomerek esetén sikerült megállapítani, hogy a homooligomereknek nincs egyetlen preferált konformációja, inkább egyszerre több helikális és hajlított konformert foglalnak el a peptidek. A több stabil konformer jelenléte nemcsak a megfigyelt NOE-k által, hanem az azt támogató számítási módszerekkel kapott relatív energieloszlások által is alátámasztott. A számítások alapján a tetramer valószínűleg H16-ot, egy hajlított konformert, vagy akár H20-as hélixhez szükséges téralkatot is felvehet. Az akirális oligomerek esetén az ilyen konformációs flexibilitás előnyös tulajdonság, mivel azt jelzi, hogy a gerinc szerkezete elég rugalmas ami elvezethet a szerkezeti sokféleséghez a későbbi szekvenciális módosítások során.

#### Kitekintés

Az áttekintett eredmények számos ígéretes irányt vetítenek előre a természetes AMP-k, és a nem természetes peptidek területén. A feltárt makroszkópikus asszociátumok és az egyes példákon keresztül megértett funkcionális szerepük előrevetíti és remélhetőleg segíti a hasonló peptid-alapú szupramolekuláris lágyanyagok gyógyszerészeti és biotechnológiai alkalmazásainak elterjedését, ahol hasonló komplexképzés, majd kiterjedt asszociátumok

elérése akár *in vivo* rendszerekben is tervezhetőek lesznek. Az AMP-k komplexképződésének és szerkezetének mélyebb megértése lehetővé teszi új, hatékonyabb antimikrobiális terápiák kidolgozását. A quorum érzékelő molekulák és AMP-k által képzett királis szupramolekuláris rendszerek felvetik a kölcsönhatás és a képződmények esetleges szerepét biofilmek elleni stratégiák kidolgozásában. A biofilmekben tapasztalható antibiotikum-rezisztencia egyre súlyosabb probléma, ezért az AMP-k olyan módosítása, amely fokozza azok hatékonyságát biofilmek ellen, kulcsfontosságú áttörést jelenthet. A nem természetes  $\beta$ -peptidek szupramolekuláris szerkezeti sajátosságai remélhetőleg kiaknázhatóak lesznek új generációs membránaktív gyógyszerek kifejlesztésében. Az ilyen struktúrák kontrollált aggregációja lehetőséget biztosít a célzott bakteriális sejtkárosításra, miközben minimalizálhatja a gazdasejtekre gyakorolt toxikus hatásokat. Az LPS által indukált sejtfelszínről induló lamelláris morfológiák képzése remélhetőleg új fejezetet nyit a bioinspirált szupramolekuláris antibiotikumok fejlesztésében. A triazol peptidek szerkezeti alapjainak felderítése remélhetően hozzájárul újfajta peptid-alapú nanokompozitok kifejlesztéséhez. Az 5Tzl kanyart preferáló konformerei már ma is alkalmazásra kerülnek fehérjékben történő prolin aminosavak helyettesítésére. Szubsztituált oligopeptidjeik tulajdonságai klikk-kémián keresztül elérhető hidrogél mátrixokat vetít előre, melyre remélhetőleg a jövőben egyre több példát láthatunk.

Az egzotikus peptidek változatos összetétele és szerkezete egyenlőre számos szerteágazó, egyedi esetet ír le, mely pont ellentétes a természetes peptidek és fehérjék egységes felépítésével szemben. Utóbbiak szerkezeti tulajdonságait így viszonylag könnyű adatbázisokba csatornázni, mely megalapozta az AI-alapú, adatbázisokra támaszkodó tervezésüket (Alföld). Azonban kijelenthető, hogy a növekvő mennyiségű egyedi esettanulmány, valamint az AI intuitív algoritmusainak gyors fejlődése közösen eléri majd azt a kritikus pontot ahonnan az új szekvenciák tervezése költséghatékony rutinfeladattá válik, és igazi áttörést eredményezhet az egzotikus rendszerek tényérésében.

## Az értekezés alapját adó közlemények

---

- D1. G. Kohut, A. Sieradzan, F. Zsila, T. Juhász, Sz. Bősze, A. Liwo, S. Samsonov, **T. Beke-Somfai**: The molecular mechanism of structural changes in the antimicrobial peptide CM15 upon complex formation with the drug molecule suramin: a computational analysis *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 10644-10659
- D2. T. Juhász, J. Mihály, G. Kohut, C. Németh, K. Liliom, **T. Beke-Somfai**: The lipid mediator lysophosphatidic acid induces folding of disordered peptides with basic amphipathic character into rare conformations *Scientific Reports*, **2018**, *8*, 14499
- D3. F. Zsila, M. Ricci, I. Cs. Szigyártó, P. Singh, **T. Beke-Somfai**: Quorum Sensing Pseudomonas Quinolone Signal Forms Chiral Supramolecular Assemblies with the Host Defense Peptide LL-37, *Front. Mol. Biosci.*, **2021**, *8*, 742023
- D4. T. Juhász, M. Quemé-Peña, B. Kővágó, J. Mihály, M. Ricci, K. Horváti, Sz. Bősze, F. Zsila, **T. Beke-Somfai**: Interplay between membrane Aktive host defense peptides and heme modulates their assemblies and in vitro activity, *Scientific Reports*, **2021**, *11*, 18328
- D5. G. Kohut, T. Juhász, M. Quemé-Peña, Sz. Bősze, **T. Beke-Somfai**: Controlling Peptide Function by Directed Assembly Formation: Mechanistic Insight using Multiscale Modelling on an Antimicrobial Peptide – Drug – Membrane system, *ACS Omega*, **2021**, *6*, 24, 15756–15769
- D6. M. Quemé-Peña, T. Juhász, J. Mihály, I. Cs. Szigyártó, K. Horváti, Sz. Bősze, J. Henczkó, B. Pályi, Cs. Németh, Z. Varga, F. Zsila, **T. Beke-Somfai**: Manipulating Active Structure and Function of Cationic Antimicrobial Peptide CM15 by the Polysulfonated Drug Suramin: A Step Closer to *in vivo* Complexity *ChemBioChem*, **2019**, *20*, 1578-1590
- D7. M. Ricci, K. Horváti, T. Juhász, I. Szigyártó, Gy. Török, F. Sebák, A. Bodor, L. Homolya, J. Henczkó, B. Pályi, T. Mlinkó, J. Mihály, B. Nizami, Z. Yang, F. Lin, X. Lu, L. Románszki, A. Bóta, Z. Varga, Sz. Bősze, F. Zsila, **T. Beke-Somfai**: Anionic Food Color Tartrazine Enhances Antibacterial Efficacy of Histatin-derived Peptide DHVAR4 by Fine-Tuning its Membrane Activity *Quarterly Reviews of Biophysics*, **2020**, *53*, E5
- D8. **T. Beke**, A. Czajlik, B. Bálint, A. Perczel: A Theoretical Comparison of Self-Assembling  $\alpha$ - and  $\beta$ -Peptide Nanostructures: Toward Design of  $\beta$ -Barrel Frameworks *ACS Nano*, **2008**, *2*, 545-553
- D9. I. Cs. Szigyártó, J. Mihály, A. Wacha, D. Bogdán, T. Juhász, G. Kohut, G. Schlosser, F. Zsila, V. Urlacher, Z. Varga, F. Fülöp, A. Bóta, I. Mándity, **T. Beke-Somfai**: Membrane active Janus-oligomers of  $\beta^3$ -peptides, *Chemical Science*, **2020**, *11*, 6868-6881
- D10. K. El Battioui, S. Chakraborty, A. Wacha, D. Molnár, M. Quemé-Peña, I. Cs. Szigyártó, Cs. L. Szabó, A. Bodor, K. Horváti, G. Gyulai, Sz. Bősze, J. Mihály, B. Jezsó, L. Románszki, J. Tóth, Z. Varga, I. Mándity, T. Juhász, **T. Beke-Somfai**: In situ captured antibacterial action of membrane incising peptide lamellae, *Nat. Commun.*, **2024**, *15*, 3424
- D11. A. Said-Ståhlmeden, A. J. Paterson, I. Cs. Szigyártó, L. Thunberg, J. R. Johansson, **T. Beke-Somfai**, N. Kann: Chiral 1,5-disubstituted 1,2,3-triazoles - versatile tools for foldamers and peptidomimetic applications, *Organic & Biomolecular Chemistry*,

2020, 18, 1957-1967

- D12. N. Kann, J. R. Johansson, **T. Beke-Somfai**: Conformational properties of 1,4- and 1,5-substituted 1,2,3-triazole amino acids – building units for peptidic foldamers, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2015**, 13, 2776-2785
- D13. J. Johansson, E. Hermansson, N. Kann, B. Nordén, **T. Beke-Somfai**:  $\delta$ -Peptides from RuAAC-Derived 1,5-Disubstituted Triazole Units, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 13, 2703-2713
- D14. J. Johansson, **T. Beke-Somfai**, A. Said Stalsmeden, N. Kann: Ruthenium-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition Reaction: Scope, Mechanism and Applications, *Chemical Reviews*, **2016**, 116, 14726-14768

## Kapcsolódó közlemények

---

- 1) F. Ferrara, **T. Beke-Somfai**, N. Kann: Recent Developments in the Ruthenium-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition (RuAAC) Reaction, *EurJOC*, **2024**, 10.1002/ejoc.202400113
- 2) S. Chakraborty, K. El Battioui, **T. Beke-Somfai**: Peptide-based Assemblies for Supercapacitor Applications, *Small Science*, **2024**, 4, 2300217
- 3) E. N. Frigini, R. D. Porasso, **T. Beke-Somfai**, J. J. López Cascales, R. D. Enriz, S. Pantano: The Mechanism of Antimicrobial Small-Cationic Peptides from Coarse-Grained Simulations, *J. Chem Inf. Model*, **2023**, 63, 21, 6877-6889
- 4) A. Wacha, Z. Varga, **T. Beke-Somfai**: Comparative Study of Molecular Mechanics Force Fields for beta-Peptidic Foldamers: Folding and Self-Association, *J. Chem Inf. Model*, **2023**, 63, 12, 3799-3813
- 5) T. Juhász, M. Quemé-Peña, **T. Beke-Somfai**: Unique thermophoretic behavior of supramolecular assemblies of cationic antimicrobial peptides with anionic small molecule agents, *J. Mol. Liquids*, **2023**, 122513,
- 6) A. Wacha, **T. Beke-Somfai**: PmlBeta: A PyMOL extension for building beta-amino acid insertions and beta-peptide sequences, *SoftwareX*, **2021**, 13, 100654
- 7) B. Balogh, M. Ivánczi, B. Nizami, **T. Beke-Somfai**, I. Mándity: ConjuPepDB: a database of peptide-drug conjugates, *Nucl. Acid. Res.*, **2021**, D1, D1094-D1101
- 8) T. Juhász, M. Quemé-Peña, **T. Beke-Somfai**: Unique thermophoretic behavior of supramolecular assemblies of cationic antimicrobial peptides with anionic small molecule agents, *J. Mol. Liquids*, **2023**, 122513.
- 9) C. Wang, Y. Luo, X. Li, F. Zhang, F. Wang, X. Han, T. Wang, **T. Beke-Somfai**, X. Lu: Revealing Molecular-Level Interaction between a Polymeric Drug and Model Membrane via SFG and Microfluidics, *Langmuir*, **2020**, 36, 1615-1622
- 10) F. Wang, X. Li, F. Zhang, X. Liu, P. Hu, **T. Beke-Somfai**, X. Lu: Revealing Interfacial Lipid Hydrolysis Catalyzed by Phospholipase A<sub>1</sub> at Molecular Level via Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy and Fluorescence Microscopy, *Langmuir*, **2019**, 35, 12831-12838

- 11) A. Wacha, **T. Beke-Somfai**, T. Nagy Improved Modeling of Peptidic Foldamers Using a Quantum Chemical Parametrization Based on Torsional Minimum Energy Path Matching, *ChemPlusChem*, **2019**, *84*, 927-941
- 12) F. Zsila, G. Kohut, **T. Beke-Somfai**: Disorder-to-helix conformational conversion of the human immunomodulatory peptide LL-37 induced by antiinflammatory drugs, food dyes and some metabolites, *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *129*, 50-60.
- 13) F. Zsila, T. Juhász, Sz. Bősze, K. Horváti, I. Cs. Szigyártó, **T. Beke-Somfai**: Hemin and bile pigments are the secondary structure regulators of intrinsically disordered antimicrobial peptides *Chirality*, **2018**, *30*, 195-205
- 14) F. Zsila, Sz. Bősze, K. Horváti, I. Cs. Szigyártó, **T. Beke-Somfai**: Drug and dye binding induced folding of the intrinsically disordered antimicrobial peptide CM15, *RSC Advances*, **2017**, *7*, 41091-41097
- 15) S. Rocha, M. Kogan, **T. Beke-Somfai**, B. Nordén: Probing Microscopic Orientation in Membranes by Linear Dichroism, *Langmuir*, **2016**, *32*, 2841-2846
- 16) B. Lima, M. Ricci, A. Garro, T. Juhász, I. Szigyártó, Z. Papp, G. Feresin, J. G. Torre, J. L. Cascales, L. Fülöp, **T. Beke-Somfai**, R. D. Enriz: New Short cationic antibacterial peptides. Synthesis, biological activity and mechanism of action, *BBA - Biomembranes*, **2021**, *1863*, 183665
- 17) A. Czajlik, **T. Beke**, A. Bottoni, A. Perczel: Structure and Stability of Short  $\beta$ -Peptide Nanotubes: a Non-Natural Representative of Collagen *J. Phys. Chem. B* 2008, *112*, 7956-7966
- 18) G. Pohl, **T. Beke**, I. G. Csizmadia, A. Perczel: Extended Apolar  $\beta$ -Peptide Foldamers: The Role of Axis Chirality on  $\beta$ -Peptide Sheet Stability *J. Phys. Chem. B*, 2010, *114*, 9338-9348
- 19) **T. Beke**, Cs. Somlai, G. Magyarfalvi, A. Perczel, Gy. Tarczay: Chiral and Achiral Fundamental Conformational Building Units of  $\beta$ -Peptides: Isolation Conformational Study on Ac- $\beta$ -HGly-NHMe and Ac- $\beta$ -HAla-NHMe *J. Phys. Chem. B*, 2009, *113*, 7918-7926
- 20) B. Nizami, D. Bereczki-Szakál, N. Varró, K. Battioui, V. U. Nagaraj, I. Szigyártó, I. Mándity, **T. Beke-Somfai**: FoldamerDB: A database of peptidic foldamers *Nucl. Acid. Res.* **2020**, *D1*, D1122-D1128
- 21) M. Quemé-Pena, M. Ricci, T. Juhász, K. Horváti, Sz. Bősze, B. Biri-Kovács, B. Szeder, F. Zsila, **T. Beke-Somfai**: Old Polyanionic Drug Suramin Suppresses Detrimental Cytotoxicity of the Host Defense Peptide LL-37, *ACS Pharma. Transl. Sci.*, **2021**, *4*, 1, 155-167
- 22) G. Pohl, **T. Beke**, I. G. Csizmadia, A. Perczel: Extended Apolar  $\beta$ -Peptide Foldamers: The Role of Axis Chirality on  $\beta$ -Peptide Sheet Stability *J. Phys. Chem. B*, 2010, *114*, 9338-9348
- 23) **T. Beke**, Cs. Somlai, G. Magyarfalvi, A. Perczel, Gy. Tarczay: Chiral and Achiral Fundamental Conformational Building Units of  $\beta$ -Peptides: Isolation Conformational Study on Ac- $\beta$ -HGly-NHMe and Ac- $\beta$ -HAla-NHMe *J. Phys. Chem. B*, 2009, *113*, 7918-7926

- 24) A. Czajlik, **T. Beke**, A. Bottoni, A. Perczel: Structure and Stability of Short  $\beta$ -Peptide Nanotubes: a Non-Natural Representative of Collagen *J. Phys. Chem. B* 2008, *112*, 7956-7966
- 25) G. Pohl, **T. Beke-Somfai**, I. G. Csizmadia, A. Perczel: Exploiting diverse stereochemistry of  $\beta$ -amino acids: toward a rational design of sheet-forming  $\beta$ -peptide systems *Amino Acids*, 2012, *43*, 735-749
- 26) A. Wacha, **T. Beke-Somfai**, T. Nagy Improved Modeling of Peptidic Foldamers Using a Quantum Chemical Parametrization Based on Torsional Minimum Energy Path Matching, *ChemPlusChem*, **2019**, *84*, 927-941
- 27) F. Zsila, G. Kohut, **T. Beke-Somfai**: Disorder-to-helix conformational conversion of the human immunomodulatory peptide LL-37 induced by antiinflammatory drugs, food dyes and some metabolites, *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *129*, 50-60.
- 28) M. Quemé-Peña, T. Juhász, G. Kohut, M. Ricci, P. Singh, I. C. Szigyártó, Z. I. Papp, L. Fülöp, **T. Beke-Somfai**, *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, *22*, 8613
- 29) A. Wacha, **T. Beke-Somfai**: PmlBeta: A PyMOL extension for building beta-amino acid insertions and beta-peptide sequences, *SoftwareX*, **2021**, *13*, 100654
- 30) S. Chakraborty, K. El Battioui, T. Sonallya, I. Cs Szigyártó, Z. Varga, T. Juhász, **T. Beke-Somfai**: Charge and length dependent build-up of environment sensitive lamellin  $\beta$ -peptides *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2025**, *27*, 8540-8551

## Egyéb közlemények

---

- 1) C. Bellini, U. Atxabal, S. Bősze, O. Dobay, A. Horváth, I. Cs. Szigyártó, **T. Beke-Somfai**, J. Jiménez-Barbero, I. Puskás, K. Horváti Supramolecular Complexes of Ultrashort Cationic Lipopeptides with Cyclodextrins: Improved Selectivity and Therapeutic Potential *Aggregate*, **2025**, e741
- 2) I. Cs. Szigyártó, P. Singh, T. Sonallya, L. Románszki, J. Mihály, Z. Wiener, T. Bebesi, G. Mészáros, Z. Keresztes, M. Thompson, Z. Varga, **T. Beke-Somfai** ATR-Infrared Spectroscopy and Acoustic Sensing in Characterization of Blood and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma-Derived Extracellular Vesicles. In: Matta, C., Mobasheri, A., Takács, R. (eds) *The Surfaceome. Methods in Molecular Biology*, vol 2908. Humana, New York, NY. **2025**, 225-238
- 3) T. Sonallya, A. Gaál, I. Cs. Szigyártó, Z. Varga, **T. Beke-Somfai** Biophysical Profiling of Protein Corona on Red Blood Cell-Derived Extracellular Vesicles (REVs): Linear Dichroism and Microfluidic Resistive Pulse Sensing Separate Surface Clearing from Vesicle Disruption. **2025** 213-223 In: Matta, C., Mobasheri, A., Takács, R. (eds) *The Surfaceome. Methods in Molecular Biology*, vol 2908. Humana, New York
- 4) T. Sonallya, T. Juhász, I. Cs. Szigyártó, K. Ilyés, P. Singh, D. Khamari, E. I. Buzás, Z. Varga, **T. Beke-Somfai**, Categorizing interaction modes of antimicrobial peptides with extracellular vesicles: Disruption, membrane trespassing, and clearance of the protein corona *J. Coll. & Int. Sci.* **2025**, *679*, 496-509
- 5) O. Pavela, T. Juhász\*, L. Tóth, A. Czajlik, Gy. Batta, L. Galgóczy, **T. Beke-Somfai** : Mapping of the Lipid-Binding Regions of the Antifungal Protein NFAP2 by Exploiting Model Membrane *J. Chem. Inf. Model.* **2024**, *64*, 16, 6557–6569

- 6) Welsh et al.: Minimal Information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches, *J. Extracell. Ves.*, **2024**, *13*, e12404
- 7) P. Singh, I. Cs. Szigyártó, M. Ricci, A. Gaál, M. M. Queme Peña, D. Kitka, L. Fülöp, L. Turiák, L. Drahos, Z. Varga, **T. Beke-Somfai**: Removal and identification of external protein corona members from RBC-derived extracellular vesicles by surface manipulating antimicrobial peptides, *Journal of Extracellular Biology*, **2023**, DOI: 10.1002/jex2.78
- 8) V. U. Nagaraj, T. Juhász, M. Quemé-Peña, I. Cs. Szigyártó, D. Bogdán, A. Wacha, J. Mihály, L. Románszki, Z. Varga, J. Andréasson, I. Mándity, **T. Beke-Somfai**: Stimuli-Responsive Membrane Anchor Peptide Nanofoils for Tunable Membrane Association and Lipid Bilayer Fusion, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2022**, *14*, 55320
- 9) Z. Varga, M. Madai, G. Kemenesi, **T. Beke-Somfai**, F. Jakab: Single-particle detection of native SARS-CoV-2 virions by microfluidic resistive pulse sensing, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2022**, *218*, 112716
- 10) V. Tóth, H. Vadászi, L. Ravasz, D. Mittli, D. Mátyás, T. Molnár, A. Micsonai, T. Szaniszló, P. Lőrincz, R. Kovács, T. Juhász, **T. Beke-Somfai**, G. Juhász, B. A. Györfly, K. A. Kékesi, J. Kardos: Neuronal-specific septin-3 binds Atg8/LC3B, accumulates and localizes to autophagosomes during induced autophagy, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2022**, *78*, 9, 1-18
- 11) T. Bebesi, D. Kitka, A. Gaál, I. Cs. Szigyártó, R. Deák, **T. Beke-Somfai**, K. Korpivanacz, T. Juhász, A. Bóta, Z. Varga, J. Mihály: Storage conditions determine the characteristics of red blood cell derived extracellular vesicles, *Scientific Reports*, **2022**, *12*, 977
- 12) Paterson, A. J.; **Beke-Somfai, T.**; Kann, N., In *Science of Synthesis: Click Chemistry*, Rutjes, F. P. J. T., Ed.; Thieme: Stuttgart, **2022**; p 289-335. DOI: 10.1055/sos-SD-235-00118
- 13) D. Papp, I.C. Szigyártó, B. Nordén, A. Perczel, **T. Beke-Somfai**: Structural Water Stabilizes Protein Motifs in Liquid Protein Phase: The Folding Mechanism of Short  $\beta$ -Sheets Coupled to Phase Transition, *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, *22*, 8595
- 14) B. Balogh, M. Ivánczi, B. Nizami, **T. Beke-Somfai**, I. Mándity: ConjuPepDB: a database of peptide-drug conjugates, *Nucl. Acid. Res.*, **2021**, *D1*, D1094-D1101
- 15) M. Quemé-Peña, M. Ricci, T. Juhász, K. Horváti, Sz. Bősze, B. Biri-Kovács, B. Szeder, F. Zsila, **T. Beke-Somfai**: Old Polyanionic Drug Suramin Suppresses Detrimental Cytotoxicity of the Host Defense Peptide LL-37, *ACS Pharma. Transl. Sci.*, **2021**, *4*, 1, 155-167
- 16) Y. Xiao, S. Rocha, C. C. Kitts, A. Reymer, **T. Beke-Somfai**, K. Frederick, B. Nordén: Michler's Hydrol Blue Elucidates Structural Differences in Prion Strains, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2020**, *117*, 29677-29683
- 17) P. Singh, I. Cs. Szigyártó, M. Ricci, F. Zsila, T. Juhász, J. Mihály, Sz. Bősze, J. Kardos, D. Kitka, Z. Varga, **T. Beke-Somfai**: Membrane active peptides remove surface adsorbed protein corona from extracellular vesicles of red blood cells, *Frontiers in Chemistry*, **2020**, *8* : 703, doi: 10.3389/fchem.2020.00703
- 18) F. Zsila, **T. Beke-Somfai**: Human host-defense peptide LL-37 targets stealth siderophores, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *526*, 780-785

- 19) C. Wang, Y. Luo, X. Li, F. Zhang, F. Wang, X. Han, T. Wang, **T. Beke-Somfai**, X. Lu: Revealing Molecular-Level Interaction between a Polymeric Drug and Model Membrane via SFG and Microfluidics, *Langmuir*, **2020**, *36*, 1615-1622
- 20) R. Deák, J. Mihály, I. Cs. Szigyártó, **T. Beke-Somfai**, L. Turiák, L. Drahos, A. Wacha, A. Bóta, Z. Varga: Nanoerythrocytes tailoring: Lipid induced protein scaffolding in ghost membrane derived vesicles *Materials Science & Engineering C*, **2020**, *109*, 110428
- 21) F. Zsila, Sz. Bősze, **T. Beke-Somfai**: Interaction of antitubercular drug candidates with  $\alpha$ 1-acid glycoprotein produced in pulmonary granulomas *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *147*, 1318-1327
- 22) D. Kitka, J. Mihály, J-L Fraikin, **T. Beke-Somfai**, Z. Varga: Detection and phenotyping of extracellular vesicles by size exclusion chromatography coupled with on-line fluorescence detection *Scientific Reports*, **2019**, *9*, 1, 19868
- 23) F. Wang, X. Li, F. Zhang, X. Liu, P. Hu, **T. Beke-Somfai**, X. Lu: Revealing Interfacial Lipid Hydrolysis Catalyzed by Phospholipase A<sub>1</sub> at Molecular Level via Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy and Fluorescence Microscopy, *Langmuir*, **2019**, *35*, 12831-12838
- 24) G. Kohut, A. Liwo, S. Bosze, **T. Beke-Somfai**, S. A. Samsonov: Protein-Ligand Interaction Energy-Based Entropy Calculations: Fundamental Challenges For Flexible Systems, *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 7821-7827
- 25) U. Uciechowska-Kaczmarzyk, S. Babik, F. Zsila, K. K. Bojarski, **T. Beke-Somfai**, S. A. Samsonov: Molecular Dynamics-based model for VEGF-A and its heparin interactions *J. Mol. Graph. Model.*, **2018**, *82*, 157-166
- 26) F. Zsila, T. Juhász, G. Kohut, and **T. Beke-Somfai**: Heparin and Heparan Sulfate Binding of the Antiparasitic Drug 2 Imidocarb: Circular Dichroism Spectroscopy, Isothermal Calorimetry, 3 and Computational Studies, *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 1781-1791
- 27) I. Cs. Szigyártó, R. Deák, J. Mihály, S. Rocha, F. Zsila, Z. Varga, **T. Beke-Somfai**: Flow-Alignment of Extracellular Vesicles: Structure and Orientation of Membrane Associated Biomacromolecules Studied with Polarized Light, *ChemBioChem*, **2018**, *19*, 545-551
- 28) F. Zsila, T. Juhász, Sz. Bősze, K. Horváti, I. Cs. Szigyártó, **T. Beke-Somfai**: Hemin and bile pigments are the secondary structure regulators of intrinsically disordered antimicrobial peptides *Chirality*, **2018**, *30*, 195-205
- 29) R. Kiss, M. Zhu, B. Jójárt, A. Czajlik, K. Solti, Balázs Fórizs, É. Nagy, F. Zsila, **T. Beke-Somfai**, G. Tóth: Structural Features of human DJ-1 in distinct Cys106 oxidative states and their relevance to its loss of function in disease *BBA – General subjects*, **2017**, *1861*, 2619-2629
- 30) F. Zsila, Sz. Bősze, K. Horváti, I. Cs. Szigyártó, **T. Beke-Somfai**: Drug and dye binding induced folding of the intrinsically disordered antimicrobial peptide CM15, *RSC Advances*, **2017**, *7*, 41091-41097
- 31) N. Bosaeus, A. Reymer, **T. Beke-Somfai**, T. Brown, M. Takahashi, P. Wittung-Stafshede, S. Rocha, B. Nordén: A stretched conformation of DNA with a biological role?, *Quarterly Reviews of Biophysics*, **2017**, *50*, 1-11
- 32) J. Mihály, R. Deák, I. Cs. Szigyártó, A. Bóta, **T. Beke-Somfai**, Z. Varga:

- Characterization of extracellular vesicles by IR spectroscopy: Fast and simple classification based on amide and C-H stretching vibrations, *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, 2017, 1859, 459-466
- 33) S. Rocha, M. Kogan, **T. Beke-Somfai**, B. Nordén: Probing Microscopic Orientation in Membranes by Linear Dichroism, *Langmuir*, 2016, 32, 2841-2846
- 34) F. Zsila, **T. Beke-Somfai**: Dimeric Binding of Plant Alkaloid Ellipticine to Human Serum Proteins, *RSC Advances*, 2016, 6, 44096
- 35) A. Reymer, S. Babik, M. Takahashi B. Nordén, **T. Beke-Somfai**: ATP Hydrolysis in the RecA–DNA Filament Promotes Structural Changes at the Protein–DNA Interface *Biochemistry*, 2015, 54 (30), pp 4579–4582
- 36) A. Reymer, Frederick, K., S. Rocha, **T. Beke-Somfai**, C. C. Kitts, S. Lindquist, B. Nordén: Orientation of aromatic residues in amyloid cores: Structural insights into prion fiber diversity *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 2014, 111, 17158-17163
- 37) L.H. Fornander, B. Feng, **T. Beke-Somfai**, B. Nordén: UV Transition Moments of Tyrosine, *J. Phys. Chem. B*, 2014, 118, 9247-9257
- 38) M. Kogan, B. Feng, B. Nordén, S. Rocha, **T. Beke-Somfai**: Shear-Induced Membrane Fusion in Viscous Solutions *Langmuir*, 2014, 30, 4875-4878
- 39) M. Hammarson, J.R. Nilsson, S. Li, **T. Beke-Somfai**, J. Andréasson: Characterization of the Thermal and Photoinduced Reactions of Photochromic Spiroyrans in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem. B*, 2013, 117, 13561-13571
- 40) M. Kogan, B. Nordén, **T. Beke-Somfai**: High Anisotropy of Flow-aligned Bicellar Membrane Systems, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2013, 175, 105-115
- 41) F. Jonsson, **T. Beke-Somfai**, J. Andréasson, B. Nordén: Interactions of a Photochromic Spiropyran with Liposome Model Membranes *Langmuir*, 2013, 29, 2099-2013
- 42) **T. Beke-Somfai**, P. Lincoln, B. Nordén: Rate of hydrolysis in ATP synthase is fine-tuned by  $\alpha$ -subunit motif controlling active site conformation *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 2013, 110, 2117-2122
- 43) **T. Beke-Somfai**, B. Feng, B. Nordén: Energy Phase Shift as Mechanism for Catalysis, *Chem. Phys. Lett.*, 2012, 535, 169-172
- 44) M. Matson, N. Carlsson, **T. Beke-Somfai**, B. Nordén: Spectral Properties and Orientation of Voltage-Sensitive Dyes in Lipid Membranes, *Langmuir*, 2012, 28, 10808-10817
- 45) M. Kogan, **T. Beke-Somfai**, B. Nordén: Flow-alignment of bicellar lipid mixtures: orientations of probe molecules and membrane-associated biomacromolecules in lipid membranes studied with polarized light *Chem. Commun.*, 2011, 47, 7356-7358
- 46) C. C. Kitts, **T. Beke-Somfai**, B. Nordén: Michler's Hydrol Blue: A Sensitive Probe for Amyloid Fibril Detection *Biochemistry*, 2011, 50, 3451-3461
- 47) **T. Beke-Somfai**, P. Lincoln, B. Nordén: Double-lock ratchet mechanism revealing the role of  $\alpha$ SER-344 in F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 2011, 108, 4828-4833
- 48) V. Harmat, K. Domokos, D. K. Menyhárd, A. Palló, Z. Szeltner, I. Szamosi, **T. Beke-Somfai**, G. Náray-Szabó, L. Polgár: Structure and Catalysis of Acylaminoacyl Peptidase: Closed and Open Subunits of a Dimer Oligopeptidase *J. Biol. Chem.*, 2011,

286, 1987-1998

- 49) **T. Beke-Somfai**, P. Lincoln, B. Nordén: Mechanical Control of ATP Synthase Function: Activation Energy Difference between Tight and Loose Binding Sites *Biochemistry*, 2010, *49*, 401-403
- 50) **T. Beke-Somfai**, A. Perczel: Zipper-Like Unfolding of  $\beta$ -Sheets Accessed by Pioneer Water Molecules: Atomic Resolution of Forced Unfold Reveals Different Mechanisms for Parallel and Antiparallel Motifs *J. Phys. Chem. Lett.*, 2010, *1*, 1341-1345
- 51) K. E. Kövér, **T. Beke**, A. Lipták, A. Perczel: OH-rotamer equilibrium of polyalcohols determined by combined NMR three-bond scalar coupling measurements and QM calculations *J. Comput. Chem.* 2009, *30*, 540-550
- 52) A. Palló, Á. Bencsura, L. Héja, **T. Beke**, A. Perczel, J. Kardos, Á. Simon: Major human  $\alpha$ -aminobutyrate transporter: *In Silico* prediction of substrate efficacy *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2007, *364*, 952-958
- 53) I. Berente, **T. Beke**, G. Náray-Szabó: Quantum mechanical studies on the existence of a trigonal bipyramidal phosphorane intermediate in enzymatic phosphate ester hydrolysis *Theor. Chem. Acc.*, 2007, **118** 129-134
- 54) G. Pohl, **T. Beke**, J. Borbély, A. Perczel: Prediction of folding preference of 10kDa silk-like proteins using a lego-approach and *ab initio* calculations *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, *128*, 14548-14559
- 55) **T. Beke**, I. G. Csizmadia, A. Perczel: Theoretical study on tertiary structural elements of  $\beta$ -peptides: Nanotubes formed from parallel-sheet-derived assemblies of  $\beta$ -peptides *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, *128*, 5158-5167
- 56) **T. Beke**, C. Somlai, A. Perczel: Toward A Rational Design of  $\beta$ -Peptide Structures *J. Comput. Chem.* 2006, *27*, 20-38
- 57) **T. Beke**, A. Czajlik, I. G. Csizmadia, A. Perczel: Determining suitable *lego*-structures to estimate stability of larger peptide nanostructures using computational methods *Phys. Biol., Special Issue on Nanobiology*, 2006, *3* S26-S39
- 58) **T. Beke**, I. G. Csizmadia, A. Perczel: On the flexibility of  $\beta$ -peptides *J. Comput. Chem.*, 2004, *25*, 285-307.
- 59) A. Láng, A. K. Füzéry, **T. Beke**, P. Hudáky, A. Perczel: Potential Energy Curves, Surfaces and Hypersurfaces. A model to follow and understand the conformational transformations in amino acids *J. Mol. Struct., Special Issue* 2004, *675*, 163-175
- 60) P. Hudáky, **T. Beke**, A. Perczel: Side-chain conformational potential energy surfaces associated with all major backbone folds of neutral tautomers of N- and C-protected L-histidine *J. Mol. Struct.* 2002, *583*, 117-135

## Irodalomjegyzék

---

Abraham, Mark James, Teemu Murtola, Roland Schulz, et al. 2015. "GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers." *SoftwareX* 1 (September): 19–25.

- Aguilar, Marie-Isabel, and Irene Yarovsky. 2024. "Quest for New Generation Biocompatible Materials: Tailoring  $\beta$ -Peptide Structure and Interactions via Synergy of Experiments and Modelling." *Journal of Molecular Biology*, Expanding the Protein Universe, vol. 436 (21): 168646. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2024.168646>.
- Al-Shabib, Nasser Abdulatif, Javed Masood Khan, Mohammad A. Alsenaidy, et al. 2018. "Unveiling the Stimulatory Effects of Tartrazine on Human and Bovine Serum Albumin Fibrillogenesis: Spectroscopic and Microscopic Study." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 191 (February): 116–24. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.09.062>.
- "AMBER 16, University of California, San Francisco, - Sök På Google." n.d. Accessed January 13, 2025.
- Andreu, David, Josep Ubach, Anita Boman, et al. 1992. "Shortened Cecropin A-Melittin Hybrids Significant Size Reduction Retains Potent Antibiotic Activity." *FEBS Letters* 296 (2): 190–94. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80377-S](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80377-S).
- Angelo, Nicholas G., and Paramjit S. Arora. 2005. "Nonpeptidic Foldamers from Amino Acids: Synthesis and Characterization of 1,3-Substituted Triazole Oligomers." *Journal of the American Chemical Society* 127 (49): 17134–35. <https://doi.org/10.1021/ja056406z>.
- Angelo, Nicholas G., and Paramjit S. Arora. 2007. "Solution- and Solid-Phase Synthesis of Triazole Oligomers That Display Protein-like Functionality." *The Journal of Organic Chemistry* 72 (21): 7963–67. <https://doi.org/10.1021/jo701292h>.
- Appella, Daniel H., Laurie A. Christianson, Isabella L. Karle, Douglas R. Powell, and Samuel H. Gellman. 1996. " $\beta$ -Peptide Foldamers: Robust Helix Formation in a New Family of  $\beta$ -Amino Acid Oligomers." *Journal of the American Chemical Society* 118 (51): 13071–72. <https://doi.org/10.1021/ja963290l>.
- Appella, Daniel H., Laurie A. Christianson, Daniel A. Klein, Michele R. Richards, Douglas R. Powell, and Samuel H. Gellman. 1999. "Synthesis and Structural Characterization of Helix-Forming  $\beta$ -Peptides: Trans-2-Aminocyclopentanecarboxylic Acid Oligomers." *Journal of the American Chemical Society* 121 (33): 7574–81. <https://doi.org/10.1021/ja991185g>.
- Ardhammar, Malin, Per Lincoln, and Bengt Nordén. 2002. "Invisible Liposomes: Refractive Index Matching with Sucrose Enables Flow Dichroism Assessment of Peptide Orientation in Lipid Vesicle Membrane." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (24): 15313–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.192583499>.
- Arvidsson, Per I., Jens Frackenpohl, Neil S. Ryder, et al. 2001. "On the Antimicrobial and Hemolytic Activities of Amphiphilic  $\beta$ -Peptides." *ChemBioChem* 2 (10): 771–73. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20011001\)2:10%253C771::AID-CBIC771%253E3.0.CO;2-%2523](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20011001)2:10%253C771::AID-CBIC771%253E3.0.CO;2-%2523).
- Arvidsson, Per I., Neil S. Ryder, H. Markus Weiss, et al. 2003. "Antibiotic and Hemolytic Activity of a B2/B3 Peptide Capable of Folding into a 12/10-Helical Secondary Structure." *ChemBioChem* 4 (12): 1345–47. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300698>.
- Avci, Fatma Gizem, Berna Sariyar Akbulut, and Elif Ozkirimli. 2018. "Membrane Active Peptides and Their Biophysical Characterization." *Biomolecules* 8 (3): E77. <https://doi.org/10.3390/biom8030077>.
- Basu, Anirban, and Gopinatha Suresh Kumar. 2015. "Thermodynamics of the Interaction of the Food Additive Tartrazine with Serum Albumins: A Microcalorimetric Investigation." *Food Chemistry* 175 (May): 137–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.141>.
- Basu, Anirban, and Gopinatha Suresh Kumar. 2017. "Binding and Inhibitory Effect of the Dyes Amaranth and Tartrazine on Amyloid Fibrillation in Lysozyme." *The Journal of Physical Chemistry B* 121 (6): 1222–39. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b10465>.
- Becke, Axel D. 1993. "A New Mixing of Hartree–Fock and Local Density-functional Theories." *The Journal of Chemical Physics* 98 (2): 1372–77. <https://doi.org/10.1063/1.464304>.
- Beke, Tamás, Imre G. Csizmadia, and András Perczel. 2004. "On the Flexibility of Beta-Peptides." *Journal of Computational Chemistry* 25 (2): 285–307. <https://doi.org/10.1002/jcc.10357>.
- Beke, Tamás, Imre G. Csizmadia, and András Perczel. 2006. "Theoretical Study on Tertiary Structural Elements of  $\beta$ -Peptides: Nanotubes Formed from Parallel-Sheet-Derived Assemblies of  $\beta$ -Peptides." *Journal of the American Chemical Society* 128 (15): 5158–67. <https://doi.org/10.1021/ja0585127>.

- Beke, Tamás, András Czajlik, Balázs Bálint, and András Perczel. 2008. "A Theoretical Comparison of Self-Assembling Alpha- and Beta-Peptide Nanostructures: Toward Design of Beta-Barrel Frameworks." *ACS Nano* 2 (3): 545–53. <https://doi.org/10.1021/nn700252s>.
- Beke, Tamás, Csaba Somlai, and András Perczel. 2006. "Toward a Rational Design of  $\beta$ -Peptide Structures." *Journal of Computational Chemistry* 27 (1): 20–38. <https://doi.org/10.1002/jcc.20299>.
- Berg, Jeremy M. 2022. *Biochemistry (6th Edition)*. W. H. Freeman and Company. <http://ngc.digitallibrary.co.in/handle/123456789/2270>.
- Boiadjiev, Stefan E., and David A. Lightner. 2005. "Exciton Chirality. (A) Origins of and (B) Applications from Strongly Fluorescent Dipyrinone Chromophores." *Monatshefte Für Chemie / Chemical Monthly* 136 (3): 489–508. <https://doi.org/10.1007/s00706-004-0278-3>.
- Brogden, Kim A. 2005. "Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?" *Nature Reviews Microbiology* 3 (3): 238–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.
- Chai, Jeng-Da, and Martin Head-Gordon. 2008. "Long-Range Corrected Hybrid Density Functionals with Damped Atom–Atom Dispersion Corrections." *Physical Chemistry Chemical Physics* 10 (44): 6615–20. <https://doi.org/10.1039/B810189B>.
- Chang, Pamela V., Jennifer A. Prescher, Ellen M. Sletten, et al. 2010. "Copper-Free Click Chemistry in Living Animals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (5): 1821–26. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911116107>.
- Cheng, Richard P, and W. F. DeGrado. 2001. "De Novo Design of a Monomeric Helical  $\beta$ -Peptide Stabilized by Electrostatic Interactions." In *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123. no. 21. Preprint. <https://doi.org/10.1021/ja010438e>.
- Daniels, Douglas S., E. James Petersson, Jade X. Qiu, and Alanna Schepartz. 2007. "High-Resolution Structure of a Beta-Peptide Bundle." *Journal of the American Chemical Society* 129 (6): 1532–33. <https://doi.org/10.1021/ja068678n>.
- Diness, Frederik, Sanne Schoffelen, and Morten Meldal. 2017. "Advances in Merging Triazoles with Peptides and Proteins." In *Peptidomimetics I*, edited by William D. Lubell. Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/7081\\_2015\\_192](https://doi.org/10.1007/7081_2015_192).
- Dürr, Ulrich H. N., U. S. Sudheendra, and Ayyalusamy Ramamoorthy. 2006. "LL-37, the Only Human Member of the Cathelicidin Family of Antimicrobial Peptides." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Membrane Biophysics of Antimicrobial Peptides*, vol. 1758 (9): 1408–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.030>.
- Engelberg, Yizhaq, and Meytal Landau. 2020. "The Human LL-37(17-29) Antimicrobial Peptide Reveals a Functional Supramolecular Structure." *Nature Communications* 11 (1): 3894. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17736-x>.
- Esbjörner, Elin K., Kamila Oglecka, Per Lincoln, Astrid Gräslund, and Bengt Nordén. 2007. "Membrane Binding of pH-Sensitive Influenza Fusion Peptides. Positioning, Configuration, and Induced Leakage in a Lipid Vesicle Model." *Biochemistry* 46 (47): 13490–504. <https://doi.org/10.1021/bi701075y>.
- Ganguly, Dipyaman, Georgios Chamilos, Roberto Lande, et al. 2009. "Self-RNA-Antimicrobial Peptide Complexes Activate Human Dendritic Cells through TLR7 and TLR8." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (9): 1983–94. <https://doi.org/10.1084/jem.20090480>.
- Gelman, Michael A., Sara Richter, Hong Cao, Naoki Umezawa, Samuel H. Gellman, and Tariq M. Rana. 2003. "Selective Binding of TAR RNA by a Tat-Derived Beta-Peptide." *Organic Letters* 5 (20): 3563–65. <https://doi.org/10.1021/ol034977v>.
- Giuliani, Andrea, Giovanna Pirri, and Silvia Nicoletto. 2007. "Antimicrobial Peptides: An Overview of a Promising Class of Therapeutics." *Open Life Sciences* 2 (1): 1–33. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0010-5>.
- Goodman, Catherine M., Sungwook Choi, Scott Shandler, and William F. DeGrado. 2007. "Foldamers as Versatile Frameworks for the Design and Evolution of Function." *Nature Chemical Biology* 3 (5): 252–62. <https://doi.org/10.1038/nchembio876>.
- Grassi, Lucia, Giuseppantonio Masetta, Semih Esin, and Giovanna Batoni. 2017. "Combination Strategies to Enhance the Efficacy of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms." *Frontiers in Microbiology* 8 (December). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02409>.

- Guarrochena, Xabier, Maximilian Anderla, Philipp Salomon, et al. 2025. "Combination of the Amide-to-triazole Substitution Strategy with Alternative Structural Modifications for the Metabolic Stabilization of Tumor-targeting, Radiolabeled Peptides." *Journal of Peptide Science* 31 (1): e3654. <https://doi.org/10.1002/psc.3654>.
- Hale, John DF, and Robert EW Hancock. 2007. "Alternative Mechanisms of Action of Cationic Antimicrobial Peptides on Bacteria." *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 5 (6): 951–59. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.6.951>.
- Hancock, Robert E.W., Evan F. Haney, and Erin E. Gill. 2016. "The Immunology of Host Defence Peptides: Beyond Antimicrobial Activity." *Nature Reviews Immunology* 16 (5): 321–34. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.29>.
- Haney, Evan F., Sarah C. Mansour, and Robert E. W. Hancock. 2017. "Antimicrobial Peptides: An Introduction." In *Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols*, edited by Paul R. Hansen. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7_1).
- Haney, Evan F., Suzana K. Straus, and Robert E. W. Hancock. 2019. "Reassessing the Host Defense Peptide Landscape." *Frontiers in Chemistry* 7 (February): 43. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00043>.
- Hicks, Matthew R., Jarosav Kowalski, and Alison Rodger. 2010. "LD Spectroscopy of Natural and Synthetic Biomaterials." *Chemical Society Reviews* 39 (9): 3380–93. <https://doi.org/10.1039/B912917K>.
- Hintermann, Tobias, and Dieter Seebach. 1997. "The Biological Stability of  $\beta$ -Peptides: No Interactions between  $\alpha$ - and  $\beta$ -Peptidic Structures?" *Chimia* 51 (5): 244–47. <https://doi.org/10.2533/chimia.1997.244>.
- Holub, Justin M., and Kent Kirshenbaum. 2010. "Tricks with Clicks: Modification of Peptidomimetic Oligomers via Copper-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition." *Chemical Society Reviews* 39 (4): 1325–37. <https://doi.org/10.1039/B901977B>.
- Huang, Jing, and Alexander D. MacKerell. 2013. "CHARMM36 All-Atom Additive Protein Force Field: Validation Based on Comparison to NMR Data." *Journal of Computational Chemistry* 34 (25): 2135–45. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>.
- Iglesias, Valentín, Oriol Bárcenas, Carlos Pintado-Grima, Michał Burdukiewicz, and Salvador Ventura. 2024. "Structural Information in Therapeutic Peptides: Emerging Applications in Biomedicine." *FEBS Open Bio*, June 14, 2211-5463.13847. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13847>.
- Jiang, Ziqing, Adriana I. Vasil, John D. Hale, Robert E. W. Hancock, Michael L. Vasil, and Robert S. Hodges. 2008. "Effects of Net Charge and the Number of Positively Charged Residues on the Biological Activity of Amphipathic  $\alpha$ -Helical Cationic Antimicrobial Peptides." *Biopolymers* 90 (3): 369–83. <https://doi.org/10.1002/bip.20911>.
- Johansson, Johan R., Elin Hermansson, Bengt Nordén, Nina Kann, and Tamás Beke-Somfai. 2014. " $\delta$ -Peptides from RuAAC-Derived 1,5-Disubstituted Triazole Units." *European Journal of Organic Chemistry* 2014 (13): 2703–13. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201400018>.
- Juhász, Tünde, Judith Mihály, Gergely Kohut, Csaba Németh, Károly Liliom, and Tamás Beke-Somfai. 2018. "The Lipid Mediator Lysophosphatidic Acid Induces Folding of Disordered Peptides with Basic Amphipathic Character into Rare Conformations." *Scientific Reports* 8 (1): 14499. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32786-4>.
- Kabsch, W., and C. Sander. 1983. "Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features." *Biopolymers* 22 (12): 2577–637. <https://doi.org/10.1002/bip.360221211>.
- Ke, Zhihai, Hak-Fun Chow, Man-Chor Chan, Zhifeng Liu, and Kong-Hung Sze. 2012. "Head-to-Tail Dimerization and Organogelating Properties of Click Peptidomimetics." *Organic Letters* 14 (1): 394–97. <https://doi.org/10.1021/ol2031685>.
- Keresztes, Attila, Mária Szűcs, Attila Borics, et al. 2008. "New Endomorphin Analogues Containing Alicyclic  $\beta$ -Amino Acids: Influence on Bioactive Conformation and Pharmacological Profile." *Journal of Medicinal Chemistry* 51 (14): 4270–79. <https://doi.org/10.1021/jm800223t>.
- Koehbach, Johannes, and David J. Craik. 2019. "The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides." *Trends in Pharmacological Sciences* 40 (7): 517–28. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.04.012>.

- Kohut, Gergely, Adam Sieradzan, Ferenc Zsila, et al. 2019. "The Molecular Mechanism of Structural Changes in the Antimicrobial Peptide CM15 upon Complex Formation with Drug Molecule Suramin: A Computational Analysis." *Physical Chemistry Chemical Physics* 21 (20): 10644–59. <https://doi.org/10.1039/C9CP00471H>.
- Koo, Hyun, Raymond N. Allan, Robert P. Howlin, Paul Stoodley, and Luanne Hall-Stoodley. 2017. "Targeting Microbial Biofilms: Current and Prospective Therapeutic Strategies." *Nature Reviews Microbiology* 15 (12): 740–55. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>.
- Kulkarni, Ketav, Jenisi Kelderman, Harold Coleman, Marie-Isabel Aguilar, Helena Parkington, and Mark Del Borgo. 2021. "Self-Assembly of Trifunctional Tripeptides to Form Neural Scaffolds." *Journal of Materials Chemistry B* 9 (22): 4475–79. <https://doi.org/10.1039/D0TB02959A>.
- Kulkarni, Ketav, Rachel L. Minehan, Tanesh Gamot, et al. 2021. "Esterase-Mediated Sustained Release of Peptide-Based Therapeutics from a Self-Assembled Injectable Hydrogel." *ACS Applied Materials & Interfaces* 13 (49): 58279–90. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c14150>.
- Kumar, Prashant, Jayachandran N. Kizhakkedathu, and Suzana K. Straus. 2018. "Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo." *Biomolecules* 8 (1): E4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>.
- Kumar, Sanjay, and Uday Bandyopadhyay. 2005. "Free Heme Toxicity and Its Detoxification Systems in Human." *Toxicology Letters* 157 (3): 175–88. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.03.004>.
- Lam, Shu J., Neil M. O'Brien-Simpson, Namfon Pantarat, et al. 2016. "Combating Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria with Structurally Nanoengineered Antimicrobial Peptide Polymers." *Nature Microbiology* 1 (11): 16162. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.162>.
- Lee, Chengteh, Weitao Yang, and Robert G. Parr. 1988. "Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density." *Physical Review B* 37 (2): 785–89. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>.
- Levin, Aviad, Tuuli A. Hakala, Lee Schnaider, Gonçalo J. L. Bernardes, Ehud Gazit, and Tuomas P. J. Knowles. 2020. "Biomimetic Peptide Self-Assembly for Functional Materials." *Nature Reviews Chemistry* 4 (11): 615–34. <https://doi.org/10.1038/s41570-020-0215-y>.
- Lewies, Angélique, Lissinda H. Du Plessis, and Johannes F. Wentzel. 2019. "Antimicrobial Peptides: The Achilles' Heel of Antibiotic Resistance?" *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 11 (2): 370–81. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9465-0>.
- Li Petri, Giovanna, Simona Di Martino, and Maria De Rosa. 2022. "Peptidomimetics: An Overview of Recent Medicinal Chemistry Efforts toward the Discovery of Novel Small Molecule Inhibitors." *Journal of Medicinal Chemistry* 65 (11): 7438–75. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00123>.
- Li, Yanmei, Qi Xiang, Qihao Zhang, Yadong Huang, and Zhijian Su. 2012. "Overview on the Recent Study of Antimicrobial Peptides: Origins, Functions, Relative Mechanisms and Application." *Peptides* 37 (2): 207–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001>.
- Ma, Tianyue, Yanchao Liu, Bingxin Yu, et al. 2025. "DRAMP 4.0: An Open-Access Data Repository Dedicated to the Clinical Translation of Antimicrobial Peptides." *Nucleic Acids Research* 53 (D1): D403–10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1046>.
- Ma, Xu, Qiang Wang, Kexin Ren, et al. 2024. "A Review of Antimicrobial Peptides: Structure, Mechanism of Action, and Molecular Optimization Strategies." *Fermentation* 10 (11): 540. <https://doi.org/10.3390/fermentation10110540>.
- Mangoni, Maria Luisa, and Bruno Casciaro. 2020. "Development of Antimicrobial Peptides from Amphibians." *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 9 (11): 772. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110772>.
- Marion, Antoine, Jerzy Góra, Oliver Kracker, et al. 2018. "Amber-Compatible Parametrization Procedure for Peptide-like Compounds: Application to 1,4- and 1,5-Substituted Triazole-Based Peptidomimetics." *Journal of Chemical Information and Modeling* 58 (1): 90–110. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00305>.
- Martinek, Tamás A., and Ferenc Fülöp. 2012. "Peptidic Foldamers: Ramping up Diversity." *Chemical Society Reviews* 41 (2): 687–702. <https://doi.org/10.1039/C1CS15097A>.

- Martinek, Tamás A., Anasztázia Hetényi, Livia Fülöp, et al. 2006. "Secondary Structure Dependent Self-Assembly of  $\beta$ -Peptides into Nanosized Fibrils and Membranes." *Angewandte Chemie International Edition* 45 (15): 2396–400. <https://doi.org/10.1002/anie.200504158>.
- Matsuzaki, Katsumi. 2009. "Control of Cell Selectivity of Antimicrobial Peptides." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1788 (8): 1687–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.013>.
- Melo, Manuel N., Rafael Ferre, and Miguel A. R. B. Castanho. 2009. "Antimicrobial Peptides: Linking Partition, Activity and High Membrane-Bound Concentrations." *Nature Reviews Microbiology* 7 (3): 245–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2095>.
- Mercer, Derry K., Marcelo D. T. Torres, Searle S. Duay, et al. 2020. "Antimicrobial Susceptibility Testing of Antimicrobial Peptides to Better Predict Efficacy." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00326>.
- Micsónai, András, Frank Wien, Linda Kernya, et al. 2015. "Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (24): E3095–103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500851112>.
- Montagnat, Oliver D., Guillaume Lessene, and Andrew B. Hughes. 2010. "Synthesis of Azide-Alkyne Fragments for 'Click' Chemical Applications. Part 2. Formation of Oligomers from Orthogonally Protected Chiral Trialkylsilylhomopropargyl Azides and Homopropargyl Alcohols." *The Journal of Organic Chemistry* 75 (2): 390–98. <https://doi.org/10.1021/jo9021887>.
- Morris, Garrett M., David S. Goodsell, Robert S. Halliday, et al. 1998. "Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function." *Journal of Computational Chemistry* 19 (14): 1639–62. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14%253C1639::AID-JCC10%253E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14%253C1639::AID-JCC10%253E3.0.CO;2-B).
- Morrison, Chris. 2018. "Constrained Peptides' Time to Shine?" *Nature Reviews Drug Discovery* 17 (8): 531–33. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.125>.
- Mosca, Simone, Janos Keller, Nahid Azzouz, et al. 2014. "Amphiphilic Cationic  $\beta$ 3R3-Peptides: Membrane Active Peptidomimetics and Their Potential as Antimicrobial Agents." *Biomacromolecules* 15 (5): 1687–95. <https://doi.org/10.1021/bm500101w>.
- Motamed, Sepideh, Mark P. Del Borgo, Kun Zhou, et al. 2019. "Migration and Differentiation of Neural Stem Cells Diverted From the Subventricular Zone by an Injectable Self-Assembling  $\beta$ -Peptide Hydrogel." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7 (November): 315. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00315>.
- Nguyen, Leonard T., Evan F. Haney, and Hans J. Vogel. 2011. "The Expanding Scope of Antimicrobial Peptide Structures and Their Modes of Action." *Trends in Biotechnology* 29 (9): 464–72. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>.
- Nizami, Bilal, Dorottya Bereczki-Szakál, Nikolett Varró, et al. 2019. "FoldamerDB: A Database of Peptidic Foldamers." *Nucleic Acids Research*, November 5, gkz993. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz993>.
- Nordén, Bengt, Alison Rodger, and Tim Dafforn. 2010. *Linear Dichroism and Circular Dichroism: A Textbook on Polarized-Light Spectroscopy*. With Royal Society of Chemistry (Great Britain). Royal Society of Chemistry.
- Owji, Hajar, Navid Nezafat, Manica Negahdaripour, Ali Hajiebrahimi, and Younes Ghasemi. 2018. "A Comprehensive Review of Signal Peptides: Structure, Roles, and Applications." *European Journal of Cell Biology* 97 (6): 422–41. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.06.003>.
- Payne, Jennifer A. E., Ketav Kulkarni, Thierry Izore, et al. 2021. "Staphylococcus Aureus Entanglement in Self-Assembling  $\beta$ -Peptide Nanofibres Decorated with Vancomycin." *Nanoscale Advances* 3 (9): 2607–16. <https://doi.org/10.1039/d0na01018a>.
- Perczel, Andras, Janos G. Angyan, Marton Kajtar, et al. 1991. "Peptide Models. 1. Topology of Selected Peptide Conformational Potential Energy Surfaces (Glycine and Alanine Derivatives)." *Journal of the American Chemical Society* 113 (16): 6256–65. <https://doi.org/10.1021/ja00016a049>.
- Pescitelli, Gennaro, Lorenzo Di Bari, and Nina Berova. 2014. "Application of Electronic Circular Dichroism in the Study of Supramolecular Systems." *Chemical Society Reviews* 43 (15): 5211–33. <https://doi.org/10.1039/C4CS00104D>.
- Pohl, Gábor, Tamás Beke-Somfai, Imre G. Csizmadia, and András Perczel. 2012. "Exploiting Diverse Stereochemistry of  $\beta$ -Amino Acids: Toward a Rational Design of Sheet-Forming  $\beta$ -Peptide Systems." *Amino Acids* 43 (2): 735–49. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1124-7>.

- Quemé-Peña, Mayra, Tünde Juhász, Judith Mihály, et al. 2019. "Manipulating Active Structure and Function of Cationic Antimicrobial Peptide CM15 with the Polysulfonated Drug Suramin: A Step Closer to in Vivo Complexity." *ChemBioChem* 20 (12): 1578–90. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800801>.
- Ramachandran, G. N., C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan. 1963. "Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations." *Journal of Molecular Biology* 7 (July): 95–99. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(63\)80023-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(63)80023-6).
- Rostovtsev, Vsevolod V., Luke G. Green, Valery V. Fokin, and K. Barry Sharpless. 2002. "A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective 'Ligation' of Azides and Terminal Alkynes." *Angewandte Chemie International Edition* 41 (14): 2596–99. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14%253C2596::AID-ANIE2596%253E3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14%253C2596::AID-ANIE2596%253E3.0.CO;2-4).
- Saleh, Magda M. S., Elham Y. Hashem, and Najat O. A. Al-Salahi. 2016. "Oxidation and Complexation-Based Spectrophotometric Methods for Sensitive Determination of Tartrazine E102 in Some Commercial Food Samples." *Computational Chemistry* 4 (2): 2. <https://doi.org/10.4236/cc.2016.42005>.
- Samsonov, Sergey A., Jan-Philip Gehrcke, and M. Teresa Pisabarro. 2014. "Flexibility and Explicit Solvent in Molecular-Dynamics-Based Docking of Protein–Glycosaminoglycan Systems." *Journal of Chemical Information and Modeling* 54 (2): 582–92. <https://doi.org/10.1021/ci4006047>.
- Sang, Peng, and Jianfeng Cai. 2023. "Unnatural Helical Peptidic Foldamers as Protein Segment Mimics." *Chemical Society Reviews* 52 (July). <https://doi.org/10.1039/d2cs00395c>.
- Sankari, Siva, Vignesh M. P. Babu, Ke Bian, et al. 2022. "A Haem-Sequestering Plant Peptide Promotes Iron Uptake in Symbiotic Bacteria." *Nature Microbiology* 7 (9): 1453–65. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01192-y>.
- Sato, Hiromi, and Jimmy B. Feix. 2008. "Lysine-Enriched Cecropin-Mellitin Antimicrobial Peptides with Enhanced Selectivity." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (12): 4463–65. <https://doi.org/10.1128/AAC.00810-08>.
- Schiffer, Marianne, and Allen B. Edmundson. 1967. "Use of Helical Wheels to Represent the Structures of Proteins and to Identify Segments with Helical Potential." *Biophysical Journal* 7 (2): 121–35.
- Schmitt, T. H., W. A. Frezzatti, and S. Schreier. 1993. "Hemin-Induced Lipid Membrane Disorder and Increased Permeability: A Molecular Model for the Mechanism of Cell Lysis." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 307 (1): 96–103. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1566>.
- Seebach, Dieter, Stefan Abele, Jürg V Schreiber, et al. 1998. "Biological and Pharmacokinetic Studies with  $\beta$ -Peptides." *CHIMIA* 52 (12 SE-Note): 734. <https://doi.org/10.2533/chimia.1998.734>.
- Seebach, Dieter, Albert K Beck, and Daniel J Bierbaum. 2004. "The World of  $\beta$ - and  $\gamma$ -Peptides Comprised of Homologated Proteinogenic Amino Acids and Other Components." *Chemistry & Biodiversity* 1: 1111–239.
- Seebach, Dieter, Mark Overhand, Florian N. M. Kühnle, et al. 1996. " $\beta$ -Peptides: Synthesis by Arndt-Eistert Homologation with Concomitant Peptide Coupling. Structure Determination by NMR and CD Spectroscopy and by X-Ray Crystallography. Helical Secondary Structure of a  $\beta$ -Hexapeptide in Solution and Its Stability towards Pepsin." *Helvetica Chimica Acta* 79 (4): 913–41. <https://doi.org/10.1002/hlca.19960790402>.
- Seo, Min-Duk, Hyung-Sik Won, Ji-Hun Kim, et al. 2012. "Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review." *Molecules* 17 (10): 12276–86. <https://doi.org/10.3390/molecules171012276>.
- Shukla, Rhythm, Francesca Lavore, Sourav Maity, et al. 2022. "Teixobactin Kills Bacteria by a Two-Pronged Attack on the Cell Envelope." *Nature* 608 (7922): 390–96. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05019-y>.
- Stålsmeden, Anna Said, Andrew J. Paterson, Imola Cs Szigyártó, et al. 2020. "Chiral 1,5-Disubstituted 1,2,3-Triazoles – Versatile Tools for Foldamers and Peptidomimetic Applications." *Organic & Biomolecular Chemistry* 18 (10): 1957–67. <https://doi.org/10.1039/D0OB00168F>.
- Svensson, Frida R., Per Lincoln, Bengt Nordén, and Elin K. Esbjörner. 2007. "Retinoid Chromophores as Probes of Membrane Lipid Order." *The Journal of Physical Chemistry. B* 111 (36): 10839–48. <https://doi.org/10.1021/jp072890b>.

- Szigyártó, Imola Cs., Judith Mihály, András Wacha, et al. 2020. "Membrane Active Janus-Oligomers of  $\beta^3$ -Peptides." *Chemical Science* 11 (26): 6868–81. <https://doi.org/10.1039/D0SC01344G>.
- Tew, Gregory N., Richard W. Scott, Michael L. Klein, and William F. DeGrado. 2010. "De Novo Design of Antimicrobial Polymers, Foldamers, and Small Molecules: From Discovery to Practical Applications." *Accounts of Chemical Research* 43 (1): 30–39. <https://doi.org/10.1021/ar900036b>.
- Tomasi, J., B. Mennucci, and E. Cancès. 1999. "The IEF Version of the PCM Solvation Method: An Overview of a New Method Addressed to Study Molecular Solutes at the QM Ab Initio Level." *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 464 (1): 211–26. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(98\)00553-3](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(98)00553-3).
- Tornesello, Anna Lucia, Antonella Borrelli, Luigi Buonaguro, Franco Maria Buonaguro, and Maria Lina Tornesello. 2020. "Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities." *Molecules* 25 (12): 2850. <https://doi.org/10.3390/molecules25122850>.
- Tornøe, Christian W., Caspar Christensen, and Morten Meldal. 2002. "Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides." *The Journal of Organic Chemistry* 67 (9): 3057–64. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
- Tosteson, M. T., S. J. Holmes, M. Razin, and D. C. Tosteson. 1985. "Melittin Lysis of Red Cells." *The Journal of Membrane Biology* 87 (1): 35–44. <https://doi.org/10.1007/BF01870697>.
- Umezawa, Naoki, Michael A. Gelman, Marcia C. Haigis, Ronald T. Raines, and Samuel H. Gellman. 2002. "Translocation of a  $\beta$ -Peptide Across Cell Membranes." *Journal of the American Chemical Society* 124 (3): 368–69. <https://doi.org/10.1021/ja017283v>.
- Vanommeslaeghe, K., and A. D. Jr. MacKerell. 2012. "Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing." *Journal of Chemical Information and Modeling* 52 (12): 3144–54. <https://doi.org/10.1021/ci300363c>.
- Vanommeslaeghe, K., E. Prabhu Raman, and A. D. Jr. MacKerell. 2012. "Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges." *Journal of Chemical Information and Modeling* 52 (12): 3155–68. <https://doi.org/10.1021/ci3003649>.
- Wacha, András, and Tamás Beke-Somfai. 2021. "PmlBeta: A PyMOL Extension for Building  $\beta$ -Amino Acid Insertions and  $\beta$ -Peptide Sequences." *SoftwareX* 13 (January): 100654. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2020.100654>.
- Wacha, András, Tamás Beke-Somfai, and Tibor Nagy. 2019. "Improved Modeling of Peptidic Foldamers Using a Quantum Chemical Parametrization Based on Torsional Minimum Energy Path Matching." *ChemPlusChem* 84 (7): 927–41. <https://doi.org/10.1002/cplu.201900180>.
- Wallace, B. A. 2000. "Common Structural Features in Gramicidin and Other Ion Channels." *BioEssays* 22 (3): 227–34. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200003\)22:3%253C227::AID-BIES4%253E3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200003)22:3%253C227::AID-BIES4%253E3.0.CO;2-6).
- Wang, Junmei, Wei Wang, Peter A. Kollman, and David A. Case. 2006. "Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 25 (2): 247–60. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2005.12.005>.
- Wang, Junmei, Romain M. Wolf, James W. Caldwell, Peter A. Kollman, and David A. Case. 2004. "Development and Testing of a General Amber Force Field." *Journal of Computational Chemistry* 25 (9): 1157–74. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>.
- Wang, Pam S. P., Jennifer B. Nguyen, and Alanna Schepartz. 2014. "Design and High-Resolution Structure of a  $\beta^3$ -Peptide Bundle Catalyst." *Journal of the American Chemical Society* 136 (19): 6810–13. <https://doi.org/10.1021/ja5013849>.
- Wang, Pam S. P., and Alanna Schepartz. 2016. " $\beta$ -Peptide Bundles: Design. Build. Analyze. Biosynthesize." *Chemical Communications* 52 (47): 7420–32. <https://doi.org/10.1039/C6CC01546H>.
- Zhang, Li, Xinguo Chen, Peng Xue, et al. 2005. "Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides." *Journal of the American Chemical Society* 127 (46): 15998–99. <https://doi.org/10.1021/ja054114s>.

- Zhang, Shuming, Megan A. Greenfield, Alvaro Mata, et al. 2010. "A Self-Assembly Pathway to Aligned Monodomain Gels." *Nature Materials* 9 (7): 594–601. <https://doi.org/10.1038/nmat2778>.
- Zhao, Yan, and Donald G. Truhlar. 2008. "The M06 Suite of Density Functionals for Main Group Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, Noncovalent Interactions, Excited States, and Transition Elements: Two New Functionals and Systematic Testing of Four M06-Class Functionals and 12 Other Functionals." *Theoretical Chemistry Accounts* 120 (1): 215–41. <https://doi.org/10.1007/s00214-007-0310-x>.
- Zhong, Qing, Alberto Giovanni Busetto, Juan P. Fededa, Joachim M. Buhmann, and Daniel W. Gerlich. 2012. "Unsupervised Modeling of Cell Morphology Dynamics for Time-Lapse Microscopy." *Nature Methods* 9 (7): 711–13. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2046>.
- Zsila, Ferenc, and Tamás Beke-Somfai. 2020. "Human Host-Defense Peptide LL-37 Targets Stealth Siderophores." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 526 (3): 780–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.162>.
- Zsila, Ferenc, Szilvia Bősze, Kata Horváti, Imola Cs. Szigyártó, and Tamás Beke-Somfai. 2017. "Drug and Dye Binding Induced Folding of the Intrinsically Disordered Antimicrobial Peptide CM15." *RSC Advances* 7 (65): 41091–97. <https://doi.org/10.1039/C7RA05290A>.
- Zsila, Ferenc, Tünde Juhász, Szilvia Bősze, Kata Horváti, and Tamás Beke-Somfai. 2018. "Hemin and Bile Pigments Are the Secondary Structure Regulators of Intrinsically Disordered Antimicrobial Peptides." *Chirality* 30 (2): 195–205. <https://doi.org/10.1002/chir.22784>.

## Köszönetnyilvánítás

---

Az elmúlt másfél évtizedre visszatekintve nagyon sok embernek jár köszönet, hiszen napi szinten kaptam segítséget sok szakmai és emberi szempontból. Ezekből alább próbálom összefoglalni azokat az embereket akik a sorok írása és átgondolása közben eszembe jutottak, de végül ez a rész lett a legnehezebben megírható, mert szinte biztosra vehető, hogy méltatlanul nem említek meg valakit – jobb szándékom ellenére. Köszönöm Perczel Andrásnak, hogy nem csak kiváló témavezető volt, de később is sokat segített emberileg és szakmailag is. Nagyon sokat köszönhetek Bengt Nordénnek, aki a legtöbbet tett azért, hogy szárnyakat adjon, kinyissa előttem a lehetőségeket és segítsen magánéleti krízisünk során is. Ugyanezért köszönetet kell mondanom Per Lincolnnak is, ez a két ember nagyban járult hozzá, hogy egy részem örökké svéd maradjon.

Nagyon köszönöm Tompos Andrásnak és Bóta Attilának, akik annak idején befogadtak az intézetükbe vagy csoportjukba, és rengeteget tettek azért, hogy saját lábom elindulhassak az itthoni pályán. Az ő nyomdokain teremtettük meg Varga Zoltánnal a Biológiai Lágyműanyag platformot (BSM platform), a közös laborokat, akinek ezért kiemelt köszönet jár. Köszönöm a teljes BSM platformban minden volt és jelenlegi munkatársnak a sok segítséget. Külön köszönöm Horváti Katának és Mándity Istvánnak a peptidok szintézise, valamint a sejtes vizsgálatok során nyújtott kiváló minőségű segítséget. Wacha András, Mihály Juditot, Gaál Anikót, Németh Csabát, Zsila Ferencet, Keszthelyi Tamást köszönet illeti a biofizikai és szimulációs vizsgálatok során nyújtott sok segítségért az évek során. Köszönöm az egész Biomolekuláris Önrendeződés csoportnak a mindennapokat és a szakmai – emberi segítséget általában is: Juhász Tündének, Szigyártó Imolának a hosszútávú támogató munkáért (nem is tudom melyikőjüket írjam előbbre), hiszen a csoport az ő hathatós segítségükkel alakult ki. Nagyon köszönöm a diákoknak, poszt-doktoroknak és később csatlakozott senioroknak, hogy kitüntettek a bizalmukkal, és akiktől rengeteget tanultam én is. Ők név szerint: Bilal Nizami, Czeti Anna Krisztina, Jakab Noémi, Kohut Gergely, Kovács Benjámín, Kővágó Bence, Mayra Quemé Peña, Maria Ricci, Priyanka Singh, Sohini Chakraborty, Ujvári Kamilla, Tőkési Natália, Vasmatics Katja, Vignesh U. Nagaraj, Zineb Medjeldi. Tasvilla Sonallyát és Kamal el Battiouit külön is meg kell említenem az éveken tartó hathatós építő munkájukért, az extra lelkesedésért és erőfeszítésért amiket tettek a csoporttagok jólétéért, és a kritikus helyzetekben tanúsított emberi nagyságukért, ami nélkül nagyon másképp is alakulhatott volna a csoport dinamikája és szakmai teljesítménye. Az eredmények megszületését számos hazai kollega és barát segítette az évek során. Köszönet illeti Gáspári

Zoltánt, aki szakmai munkáján túl nagyon sokat segített a Pázmány Péter Katolikus Egyetemen, hogy kiélhessem a tanítási hajlamaimat, és kiváló diákokkal kerüljek napi kapcsolatba. Az itt megjelenített eredményekhez nagyon sokan járultak hozzá, akikkel éveken dolgoztunk közösen, akár konzorciális pályázatok keretében, akár csak lelkesedéstől hajtva kollaboráció során. A biológiai (sejtes, bakteriális, gombaellenes) vizsgálatokért köszönet illeti Bősze Szilviát, Tóth Juditot, Monostory Katalint, Galgóczi Lászlót valamint csoporttagjaikat. Az AFM méréseket Románszki Lorándnak, Keresztes Zsófiának illetve Gyulai Gergőnek köszönhetem, az NMR méréseket pedig Bodor Andreának és diákjainak. Buzás Editnek és Wiener Zoltánnak köszönöm a vezikulákhoz kapcsolódó jelentős és éveken tartó segítséget. Monostory Katalinnak és Bóta Attilának külön köszönöm a dolgozat részletes átolvasását és az iránymutató konstruktív kritikákat. Fontos megemlíteni, hogy a szakmai segítség mellett nagyon sokat tettek értem és a csoportért az AKI titkárságon dolgozó Kránicz Andrea, Jámbor Andrea és Grádné Szabó Rita. Nagy köszönet hölgyeim!

A nemzetközi kollegák közül külön köszönettel tartozom Nina Kann-nak, Daniel Enriznek és Sergey Samsonovnak, akikkel éveket dolgoztunk együtt a dolgozat témájához szorosan kapcsolódó tanulmányokon. Csizmadia Imre már eltávozott közülünk. Ugyanakkor ő volt számomra sokáig a lelkesedésem alapja és a pozitív hozzáállás kimeríthetetlen forrása, ezért mindig hálásan gondolok az ő hagyatékára. Nagy köszönet illeti az édesanyámat, édesapámat, az öcsémet Attilát és családját minden segítségükért és szeretetükért.

Végül a legfontosabb köszönet a családomnak jár. Ők azok akiknek a leghálásabb vagyok a mindennapokban adott szeretetért ami ehhez az élet nevű egészhez az erőt adja. Gyermekünknek: Ráhelnek, Máténak, Csengének és Eriknek. És persze az embernek aki a világot összetartja: Eszternek.

## FÜGGELÉK

A többi bemutatott technikával szemben a lineáris dikroizmus (LD) egy viszonylag kevésbé használt módszer, ennek köszönhetően már az elvi alapokról sem igazán érhető el információ magyarul. Az alábbi leírás csak egy bevezető bemutatása a technikának, annak részletesebb leírása nélkül. A részletes elmélet megismeréséhez a következő dedikált könyvet javaslom ((Nordén és mtsai. 2010). A dolgozathoz kapcsolódó gyakorlati példák kapcsán, valamint lényegretörőbb, de mégis részletesebb elméleti leírásokhoz az olvasó figyelmét a következő tanulmányokhoz irányítom: (Kogan és mtsai. 2014; Szigyártó és mtsai. 2018; Rocha és mtsai. 2016; Reymer és mtsai. 2014; Kogan és mtsai. 2013; 2011; Matson és mtsai. 2012).

A lineáris dikroizmus az egymásra ortogonális síkokban polarizált fény különbsége. A síkokat egy kiválasztott makroszkópikus irányhoz képest definiáljuk. Az LD jel a makroszkópikus iránytengellyel párhuzamos és az azzal merőleges síkban polarizált fény különbsége:

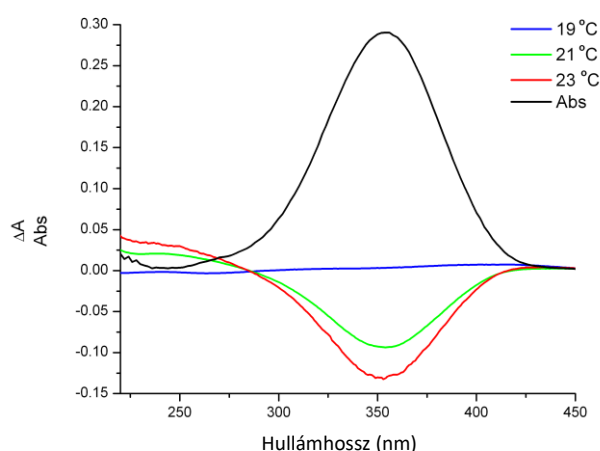
$$LD = A_{||} - A_{\perp} . \quad (1)$$

Oldatfázisban, az olyan membránrendszerek esetében mint pl. a nagy unilamellás liposzómák ('large unilamellar liposome', LUV), vagy bicellák, a makroszkópikus orientációt a lipid kettősrétegre nézve egy ún. Couette cellában keltett nyíróerő segítségével érjük el (**Error! Reference source not found.**). Noha a lipid molekulák LD hozzájárulása nagyon alacsony, azok a kromofór csoportok melyek a lipid kettősréteggel kölcsönhatnak a membrán felületén -, vagy a membránba ágyazódva- orientálódnak és ezzel LD jelük a spektrumban megjelenik. Levezetés nélkül a kvantitatív kifejezés mellyel megbecsülhetjük a membránrendszerekhez kapcsolt kromofórok orientációját a következő:

$$LD^r = \frac{LD}{A_{iso}} = \frac{3}{4} S(1 - \cos^2 \alpha). \quad (2)$$

Ahol  $LD^r$  egy dimenzió nélküli koncentrációfüggetlen változó,  $A_{iso}$  az izotrópikus adszorpció,  $S$  a makroszkópikus orientációs faktor,  $\alpha$  pedig a szög amit a kromofór elektronikus átmeneti dipólmomentuma és a membrán normál zár be. Az  $S$  orientációs faktor értéke 0 és 1 közötti tartományban értelmezett, 0 a véletlenszerű eloszlást, 1 pedig a teljes, egy irányba történő rendezettséget reprezentálja. Noha a 2-es egyenlet explicit nem kerül felhasználásra a dolgozatban szereplő LD mérések részletezésénél, az mégis fontos hiszen azzal a membránfelszínhez képest a célmolekula relatív orientációját meghatározhatjuk.

Az (2) egyenlet alapján, amennyiben ismert  $S$ , meghatározható a membránhoz asszociált molekula preferált szöge a membrán normálhoz viszonyítva. A legtöbb esetben az alkalmazott lipidrendszer orientációját, másnéven az  $S$  értékét az egyenlet felhasználásával, retinsavra, curcuminra, vagy hasonló, jól orientálható molekulákra alapozva becsüljük, mivel ezek viszonylag párhuzamosan (vagy merőlegesen) helyezkednek el a membránnormálhoz viszonyítva, ezért feltételezhető, hogy rájuk nézve  $\alpha=0^\circ$  (vagy  $\alpha=90^\circ$ ). Ennek megfelelően az orientációs faktor ( $S$ ) kiszámítható pl. a retinsav hosszú tengelyéhez tartozó átmeneti momentumát véve, amely a  $\sim 350$  nm-es abszorpciós maximumhoz tartozik (ábra lviii).



**ábra lviii. Retinsav abszorpciós spektruma (fekete), valamint LD spektrumai 19 °C és 23 °C között bicellák esetén,  $900s^{-1}$  nyíróerő jelenlétében.**

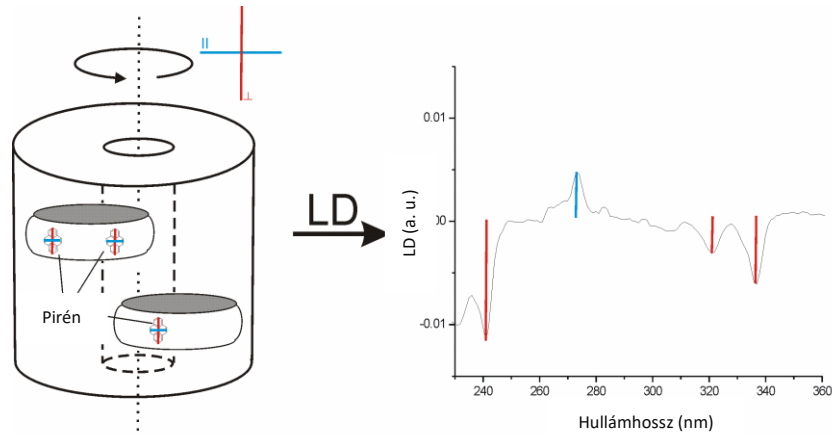
*Orientáció oldatfázisban:* A Couette áramlási cella orientációs rendszer a legszélesebb körben alkalmazott az oldat fázisú minták LD méréseihez. A cellák működési módja nagyon egyszerű, a mintát egy kvarc forgócső és egy kvarc álló rúd közé kell helyezni. A mintát tartalmazó cellában az álló és forgó rész közötti vékony mintarétegben a nyíróerő hatására orientáció jelenik meg egy makroszkopikus tengelyhez viszonyítva. A nyíróerő ( $G$ ) a következő kifejezéssel számítható:

$$G/s^{-1} = \frac{2\pi R_o \Omega}{60(R_o - R_i)} \quad (3),$$

ahol  $\Omega$  forgási sebesség (rpm),  $R_o$  és  $R_i$  (mm), pedig rendre a külső és belső sugara annak az elméleti hengernek melyben a minta elhelyezkedik.

A kvarc cellában levő mintán az áthaladó vízszintesen polarizált fényből számított párhuzamos abszorbancia, és a függőlegesen polarizált fény merőleges abszorbanciája közötti különbség eredményezi az LD spektrumot. Ehhez a módszerhez csak nagyon kis mennyiségű

elemzési minta (20 - 80  $\mu$ l) szükséges. A minta könnyű visszanyerése a rendszer másik hasznos tulajdonsága, amely lehetővé teszi az egyes minták ismételt mérését és későbbi felhasználását.



ábra lix. Folyadék fázisú LD spektroszkópia. Bal oldalon a Couette folyadék cella szematikus elrendeződése, és az átmeneti elektronikus momentum vektorok kapcsolata az észlelt spektrális csúcsokkal. A vázolt példán ún. bicella lipid kettősrétegekbe beépült pirén molekulák relatív helyzete látható. A jobb oldalon a párhuzamos (kék) illetve merőleges (piros) síkban polarizált fénynyalábokhoz kapcsolható abszorpciós jelek láthatóak.

Praktikus szempontból érdemes megjegyezni, hogy lipid rendszerekben a membrán normál leggyakrabban merőleges a rotáció irányára, vagyis a makroszkópikus orientációs irányra (ábra ii). Ez azt jelenti, hogy amennyiben egy kromofór molekula a membrán normállal preferentáltan párhuzamosan helyezkedik el, úgy negatív LD jelet ad, míg a membrán felszínére párhuzamosan (a normálra merőlegesen), úgy pozitív jelet kapunk. Lipid rendszerekről elmondható, hogy viszonylag alacsony lesz az orientációs faktoruk a Couette cellákban, liposzómák esetén  $S = \sim 0,02 - 0,1$ , míg bicellák esetén  $S = \sim 0,15 - 0,3$  között alakul.

*Technikai paraméterek:* Az LD mérések két készüléken történtek, egy Chirascan CD spektrométeren, valamint egy JASCO 1500 CD spektrométeren, mindkettő alkalmas LD mérésre és detektálásra. Mindkét készülékhez egy temperálható, külső rotációs Couette áramlási cellát használtunk, melyekben a mintában töltött teljes fényhossz 0,54 mm, illetve 0,5 mm volt. Az előállítani kívánt orientációt a külső cella forgatásával értük el, ahhoz 1000/min – 3000/min forgási sebességtartományt alkalmazva. Minden méréshez átlagspektrumokat használtunk, melyeket több alkalommal, 190 – 800 nm hullámhossz

tartomány különböző szakaszain vettünk fel, 0,5 nm-es lépésközzel és 100 nm/min pásztázási sebességgel. Az alapvonalakat nulla nyíróerő alatt, a forgó henger több álló pozíciójában vettük fel, melyek átlaga kivonásra került a spektrumokból.

### Referenciák a Függelékben

Kogan, Maxim, Tamás Beke-Somfai, és Bengt Nordén. 2011. „Flow-Alignment of Bicellar Lipid Mixtures: Orientations of Probe Molecules and Membrane-Associated Biomacromolecules in Lipid Membranes Studied with Polarized Light”. *Chemical Communications* 47 (26): 7356.

<https://doi.org/10.1039/c1cc12313k>.

Kogan, Maxim, Bobo Feng, Bengt Nordén, Sandra Rocha, és Tamás Beke-Somfai. 2014. „Shear-Induced Membrane Fusion in Viscous Solutions”. *Langmuir* 30 (17): 4875–78. <https://doi.org/10.1021/la404857r>.

Kogan, Maxim, Bengt Nordén, és Tamás Beke-Somfai. 2013. „High Anisotropy of Flow-Aligned Bicellar Membrane Systems”. *Chemistry and Physics of Lipids* 175–176 (október): 105–15.

<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.08.006>.

Matson, Maria, Nils Carlsson, Tamás Beke-Somfai, és Bengt Nordén. 2012. „Spectral Properties and Orientation of Voltage-Sensitive Dyes in Lipid Membranes”. *Langmuir* 28 (29): 10808–17.

<https://doi.org/10.1021/la301726w>.

Nordén, Bengt, Alison Rodger, és Tim Dafforn. 2010. *Linear dichroism and circular dichroism: a textbook on polarized-light spectroscopy*. With Royal Society of Chemistry (Great Britain). Royal Society of Chemistry.

Reymer, Anna, Kendra K. Frederick, Sandra Rocha, és mtsai. 2014. „Orientation of Aromatic Residues in Amyloid Cores: Structural Insights into Prion Fiber Diversity”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (48): 17158–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415663111>.

Rocha, Sandra, Maxim Kogan, Tamás Beke-Somfai, és Bengt Nordén. 2016. „Probing Microscopic Orientation in Membranes by Linear Dichroism”. *Langmuir* 32 (12): 2841–46.

<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04229>.

Szigyártó, Imola Cs., Róbert Deák, Judith Mihály, és mtsai. 2018. „Flow Alignment of Extracellular Vesicles: Structure and Orientation of Membrane-Associated Bio-Macromolecules Studied with Polarized Light”. *ChemBioChem* 19 (6): 545–51. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700378>.