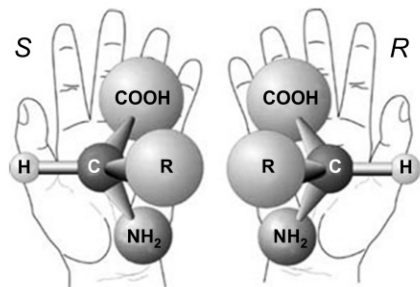


TÁVOL A HOMOKIRALITÁSTÓL, AVAGY A PEPTIDOMIMETIKUMOK ÖNRENDEZŐDÉSE

Martinek Tamás

PhD, Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerkémiai Intézet
martinek@pharm.u-szeged.hu

A földi élőlények felépítésében az aszimmetrikus molekulák kulcsszerepet játszanak. Például a legfontosabb biológiai építőelemek közül való aminosavak többsége két térbeli szerkezetet vehet fel, amelyek tükörképi párjai egymásnak csakúgy, mint a jobb és bal kezünk (1. ábra). Az ilyen aszimmetrikus molekulákat királisnak, a tükörképi viszonyban álló molekulákat enantiomereknek nevezük. A biomolekulák felépítésében néhány kivételtől eltekintve csak egyetlen enantiomer vesz részt: a fehérjéket csak balkezes aminosavak alkotják. Ezt a jelenséget hívjuk biológiai homokiralitásnak (Pályi, 1999).



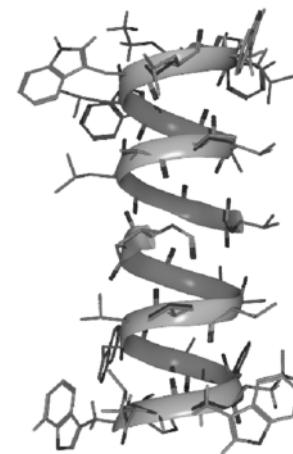
1. ábra • A természetes α -aminosavak lehetséges két térbeli konfigurációja az aszimmetrikus szénatom körül. A bal- és a jobbkezes elrendeződést rendre S és R jelöli, követve a standard kémiai nomenklaturát.

Mivel a tükörképi párok valamennyi akirális közegben vizsgált fizikai és kémiai tulajdonsága megegyezik, a biológiai homokiralitás nem magától értetődő jelenség. Már Louis Pasteur megfogalmazta, hogy az enantiomerek feldúsulása általában az élet jelenlétéről tanúskodik. Nagyon valószínű, hogy a homokiralitás és az élet eredetét közös ponton kell keresnünk, és bár számos hipotézist találhatunk erre vonatkozóan az irodalomban (Meierhenrich, 2008; Carrol, 2009), konszenzusra vezető elmélet jelenleg sincs. Az egyik alapvető kérdés ebben a vonatkozásban, hogy a homokiralitás szükséges előfeltétele-e az életért felelős makromolekulák kialakulásának, vagy csupán egy véletlen, az élet kialakulásával párhuzamos folyamat eredménye.

De miért fontos az építőelemek homokiralitása a makromolekulák létrejöttében és működésében? A biopolimerek funkciója szorosan összefügg a térbeli szerkezetükkel, és ez a térszerkezet jobbra önrendező módon alakul ki. Fehérjék esetén a feltekeredés módja az aminosavsorrendben van kódolva, s ezt információt a DNS tartalmazza. A genetikai kód nem terjed ki az aminosav-építőelemek kiralitására, implicite feltételezi a térbeliség állandóságát. A balkezes aminosavak ki-

választása már a riboszomális fehérjeszintézis magasabb szintjén történik. Az enantiomerek véletlen sorrendű beépülése a fehérjékbe a funkcióért felelős jól definiált térszerkezetek hiányát eredményezné, ami kizárja az életet. Emellett az evolúció alanyába, a DNS-fehérjerendszerbe egy rejtett, statisztikus paraméter is belekerülne, ami lehetlenné tenné az előnyös tulajdonságok szisztematikus átörökítését.

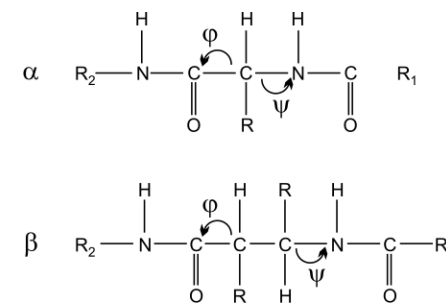
Kivételeket találunk azonban a természetben arra, hogy a balkezes és jobbkezes építőelemeket együttesen tartalmazó biopolimerek rendezett és esetenként funkcióval rendelkező térszerkezetet vesznek fel. Erre jó példa a gramicidin S antibiotikum ún. β -hélice (2. ábra) amelyet a *Bacillus brevis* baktérium termel, természetesen nem riboszomális fehérjeszintézis útján. Ebben az esetben az α -aminosavak tükörképi párjai szisztematikus felváltva épülnek be a láncba, így a szerkezet már nem homokirális, mégis képes az aminosavak sorrend által kódolt helikális önren-



2. ábra • A gramicidin bakteriális eredetű peptid által létrehozott helikális szerkezet (β -hélix). Ez a szerkezet a sejtmembrán közegében alakul ki.

deződésére. Mesterségesen előállított α -peptidoknál az építőelemek térkémiájának sorrendjét tetszőlegesen megválaszthatjuk, és ilyen esetekben is számíthatunk az önrendeződé-
re (Rana et al., 2005).

Látható, hogy a homokiralitás az önrendezés feltételeként való előírása túlságosan szigorú kritérium, ugyanakkor a véletlenszerű beépülés is kizárható. Meddig lazítható vajon a homokiralitási feltétel? Meg kell állnunk az alternáló heterokirális láncoknál, vagy létezik egy általánosabb szabály? A kérdéseink megválaszolásához vizsgáljuk meg, mi adja a fő hajtóerőt a polipeptidok önrendeződé-
séhez. Elsősorban a láncban lévő peptid-csoportok (CONH) közötti elektrosztatikus vonzás biztosítja az energianyereséget, ahol a két kölcsönható csoportnak közel párhuzamos orientációjának kell lennie: CONH—CONH. A peptid-csoportok gerinchez képest felvett irányát a φ és ψ torziós szögekkel írjuk le (Ramachandran- és Balaram-definíciók szerint, 3. ábra). Ilyenkor térben közel kerülhet-



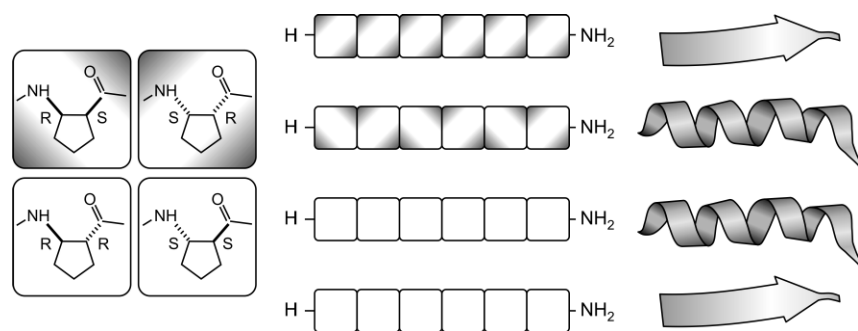
3. ábra • Az α - és a β -peptidok kémiai szerkezetének összehasonlítása. Feltüntetjük a peptidkötések orientációját leíró torziós szögeket. A β -peptidok esetén a két aszimmetrikus szénatom közötti torzió szintén befolyással van a szerkezetre, de ez nem független a φ és ψ torzióktól, és magyarázata túlmutat a jelen közlemény keretein.

nek a csoportok ellentétes töltései. A peptidkötések orientációját azonban a láncban velük szomszédos kiralitáscentrumok, az aszimmetrikus szénatomok térbelisége határozza meg.

Mivel az α -peptidek esetében egy kiralitáscentrum két peptidkötés irányára hat egyidejűleg (3. ábra), a természetes peptidek/fehérjék ebből a szempontból speciális esetnek számítanak. A térbeli konfigurációk és a peptidcsoportok iránya közötti összefüggést olyan rendszereken könnyebb vizsgálni, ahol egy centrum csak egyetlen peptidcsoport-irányra van befolyással. A legegyszerűbb ilyen építőelemek a β -aminosavak. Amíg az α -peptidek egyetlen aszimmetrikus szénatomot tartalmaznak a peptidcsoportok között, a β -peptidekben két potenciálisan aszimmetrikus szénatom található. Ez négyre emeli a lehetséges térbeli konfigurációk számát. A látszólag megnövekedett flexibilitás ellenére, a β -peptidek igen változatos másodlagos szerkezeti mintázatokat tudnak létrehozni már igen rövid lánchosszon. Az eddig ismert β -peptid hélixek már hexamer hosszúságban is nagy stabilitást mutatnak, és a peptidáz enzimek nem emésztik (Goodman et al., 2007). Ugyanúgy, mint a proteineknél, a

másodlagos szerkezetek között megtalálhatjuk a hélix és szál alaptípusokat. Homokirális építőelemekből többféle hélixet lehet előállítani. A hélixeket az őket stabilizáló hidrogénkötéses gyűrű tagzáma alapján nevezzük el, így léteznek például a H10, H12, H14 típusok (Martinek – Fülöp, 2003). A β -peptidek körében is megtaláljuk az alternáló heterokirális láncokat, melyek a természetes gramicidin β -hélixével rokon, ún. H10/12 hélixet, valamint a fehérjealkotó β -szálakhoz hasonló nem poláris szálakat hozták létre (4. ábra) (Martinek et al., 2006). A β -aminosavak kombinálhatók a természetes α -aminosavakkal is, és így további változatos struktúrák hozhatók létre. Ezek az önrendeződő peptidomimetikumok egy lényegesen szélesebb körű mintát biztosítanak a térkémi összefüggések feldeírásához.

Mivel a gerincatomok konfigurációja a torziós szögeken keresztül fejtik ki hatásukat, előbb megvizsgáltuk, hogy milyen kapcsolat van a kérdéses torziók (φ és ψ) mintázata és a másodlagos szerkezet típusa között, majd korrelációt próbáltunk találni a jobbkezes és balkezes aszimmetria-centrumok sorrendje (az abszolút konfiguráció) és a másodlagos



4. ábra • A β -peptidek körében felismert összefüggés a homokirális és az alternáló heterokirális láncok térszerkezete között

ψ][φ előjelek	másodlagos szerkezet	Peptidcsoport iránya a jobb- (P) és balmenetes (M) hélixekben*
+[+]	hélix	P: paralel; M: antiparalel
-][-]	hélix	P: antiparalel; M: paralel
+][-]	szál	
-][+]	szál	

1. táblázat • A ψ][φ torziós kombinációk által kedvezményezett másodlagos szerkezetek (* NH \rightarrow O=C H-kötés irány a N-vég \rightarrow C-vég irányhoz képest)

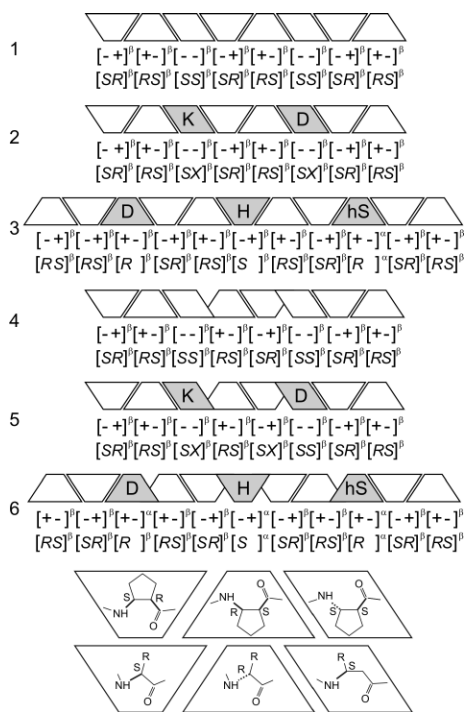
szerkezetekben mért torziós szögek között. Az irodalmi és saját adataink elemzésével az alábbi megfigyeléseket tettük (1. táblázat).

1. Hélixek esetében, a peptidkötések két oldalán csak azonos előjelű ψ és φ torziók fordulhatnak elő: +][+ vagy -][-], ahol a ']' szimbólum a CONH peptidkötést jelenti. A szál-típusú szerkezeteknél eltérő előjelű szögek figyelhetők meg: +][- vagy -][+.
2. Hélixeknél a torziós szögek előjelei meghatározzák a peptidkötés orientációját a gerinc standard irányítottágához (N-vég \rightarrow C-vég) képest. Az irány függ attól is, hogy a hélix jobb- (P) vagy balmenetes (M).
3. Mivel a peptidláncok önrendeződésének feltétele az amidcsoportok közötti (intra) molekuláris felismerés, a kölcsönhatásban lévő szakaszoknál a peptidkötések orientációjának illeszkedőnek kell lennie. Ez megköveteli a gerinc-torziók megfelelő mintázatát, amit azonban csak megfelelő sztereokémiai mintázat hozhat létre. Összegezve kimondhatjuk, hogy a hélixek és redőzött rétegek kialakulásához valóban nem szükséges a homokiralitás. A szükséges feltétel az ismétlődő térkémi mintázat jelenléte.
4. A proteinek és α -peptidek körében jól ismert a Rachandran-féle összefüggés. Ennek folyománya, hogy a balkezes szénatom kizárólag negatív előjelű (-) φ torziót tesz

lehetővé a stabilis másodlagos szerkezeteknél. A ψ szögre a sztereokémia kisebb strukturáló hatással van, mivel az felvehet pozitív (+) és negatív (-) szögeket is. Ez utóbbi valójában az α -aminosavak fent említett speciális voltából fakad. β -peptidek esetében mindkét királis szénatom erősen strukturál, és hatásuk elkülönítetten jelentkezik: balkezes konfiguráció esetén csak negatív előjelű torziós szögeket tesznek lehetővé mind a ψ , mind a φ torzióknál. A jobbkezes konfiguráció pozitív torziókat eredményez.

Hogy megvizsgáljuk ezeknek a szabályoknak az érvényességét és prediktív erejét, két különböző típusú *de novo* szekvenciát terveztünk (1–3), melyek úgy teljesítik a fenti szabályokat, hogy a várt szerkezetük helikális (5. ábra). A tervezésnél alkalmaztuk a hélixet indukáló azonos előjelű torziók és a periodikus sztereokémiai mintázat elvét, és az általánosság kedvéért az α - és β -aminosavakat kombináltunk. Létrehoztunk olyan negatív kontrollláncokat is, ahol a konfigurációkat felcseréltük (4–6).

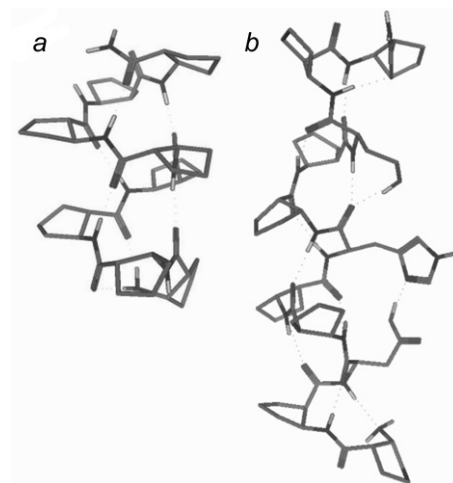
A tervezett és kontroll-peptideket szilárd hordozón, Fmoc kémiával szintetizáltuk meg, és HPLC-vel tisztítottuk. Az anyagokat deuterált dimetil-szulfoxidban, metanolban és vízben jellemeztük. A minták jelfeloldottsága jó volt, a NMR-jelek hozzárendelését a 2D



5. ábra • A *de novo* tervezett β - és $\alpha\beta$ -peptidomimetikum láncok. Az oldalláncok az aminosavaknál szokásos egybetűs kóddal vannak jelölve (hS: homo-szerin). A térbeli konfigurációkat jelölő S és R meghatározását lásd az 1. ábrán.

homonukleáris korrelációs spektrumok segítségével végeztük el. A peptidkötések árnyékolására jellemző kémiai eltolódás-hőmérsékleti koeficiens jól jelezték a stabilizáló hidrogénkötéseket. A nagyfelbontású szerkezet-meghatározást a távolható keresztrelaxációs kölcsönhatások (ROESY – Rotating frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) segítségével végeztük el, ahol a térközben lévő hidrogénatomok mutathatók ki. A tervezett szekvenciáknál egyértelműen láthatók a helikális szerkezetekre jellemző kölcsönhatások. A kontrollszekvenciáknál efféle periodi-

kus szerkezetekre jellemző jeleket nem találunk. A modellezést molekuláris mechanikai szinten kényszerfeltétel nélküli mintavételezéssel kezdtük meg. Itt a legalacsonyabb energiájú konformációs családok egyértelműen mutatták a várt helikális rendeződéseket. Az egyik szekvenciánál komplex, 9–10–11–12-tagú, egymásba fűzött H-kötéses gyűrűk stabilizálják a hélixet, és a peptidkötések alternáló orientációt mutattak. A másik modellünknel egy H14/16 típusú hélixet kaptunk, ahol a peptidorientáció (parallel–antiparallel–antiparallel)_n mintázatot adott. Ilyen hélixeket eddig nem találtak. A kontrollszekvenciák nem mutattak helikális rendeződést. A helikális konformáció detektálására elektronikus cirkuláris dichroizmus (ECD-) spektroszkópiát alkalmaztunk. Mindkét hélix esetében Cotton-effektust figyelhettünk meg. A H14/16 kontrollszekvenciája nem mutatott ECD-



6. ábra • Az 1 (a) és 3 (b) peptidláncok helikális szerkezetei. A geometriák igazolását oldatfázisban NMR- és cirkuláris dichroizmus spektroszkópiák, valamint molekulamodellezés segítségével végeztük el.

aktivitást, míg a H9-12 kontrollminta a helikalistól teljesen eltérő ECD-mintázatot mutatott. A tervezett helikális mintáknál az ECD-jelek csökkent intenzitással vízben is megtartották a jellegüket, ugyanakkor a kontrollpeptidek elvesztették szerkezetüket ebben az oldószerben. Ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy a tervezett struktúrák a szerkezet kellően stabilisak, a későbbiekben a vizes közegű biológiai alkalmazások szóba kerülhetnek.

A természetes α -aminosavakból felépülő proteinek/peptidek és a mesterséges β -peptidek másodlagos szerkezeteinek átfogó vizsgálatával felismertük, hogy a gerinc szénatomok térkémiája és a hozzájuk kapcsolódó torziós szögek között általánosítható összefüggés áll fenn. Továbbá felfigyeltünk a torziós szögek előjelének mintázata és a másodlagos szerkezet közötti kapcsolatra is. Az összefüggések jól használható eszközt adnak a térkémiá másodlagos szerkezetre gyakorolt hatásának megértéséhez. A szabályok prediktíveknek bizonyultak, mivel a segítségükkel új hélixeket tudtunk tervezni, amelyek stabilisnak mutatkoztak oldatfázisban (Mándity et al., 2009). Az eredményeink alátámasztják, hogy a polipeptid láncok önrendeződéséhez nem szükséges a homokiralitás; elegendő az említett szabályok szerinti periodikus térkémiá jelen-

léte. A mintázati megközelítés rámutatott arra is, hogy a torziók előjele, illetve az ezt befolyásoló abszolút konfigurációk egyfajta bináris kódot alkotnak, amelyek a másodlagos szerkezet alaptípusát és több tulajdonságát képesek meghatározni. Ebben az összefüggésben ezt egy szoftvernek foghatjuk fel, ami a peptidláncon mint hardveren „végrehajtható” a másodlagos szerkezetet adja kimenetként. Úgy véljük, hogy a bemutatott módszer utat nyithat újabb hélix-típusok létrehozásához, amelyek a jövőben a gyógyszerkutatás területén nyerhetnek alkalmazást (Kritzer et al., 2005).

Köszönettel tartozom az OTKA (NF69316) anyagi támogatásáért. Köszönöm a külső partnereknek (prof. dr. Tóth Gábor, dr. Fülöp Livia, dr. Hetényi Anasztázia [SZTE Orvosi Vegytani Intézet]; Prof. dr. Hollósi Miklós, dr. Vass Elemér [ELTE Kémiai Intézet]), és munkatársaimnak (Mándity István, Wéber Edit és Szolnoki Éva) az együttműködést és a segítséget. Köszönet illeti mentoromat, prof. dr. Fülöp Ferenc akadémikust.

Kulcsszavak: *peptidomimetikum, sztereokémia, aminosavak, β -aminosavak, β -peptidek, konformáció, NMR-spektroszkópia, cirkuláris dichroizmus*

IRODALOM

- Carroll, James D. (2009): A New Definition of Life. *Chirality*. **21**, 3, 354–358. <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/120082041/PDFSTART>
- Goodman, Catherine M. – Choi, S. – Shandler, S. – DeGrado, W. F. (2007): Foldamers as Versatile Frameworks for the Design and Evolution of Function. *Nature Chemical Biology*. **3**, 252–262.
- Kritzer, Joshua A. – Luedtke, N. W. – Harker, E. A. – Schepartz, A. (2005): A Rapid Library Screen for Tailoring Beta-Peptide Structure and Function.

- Journal of the American Chemical Society*. **127**, 14584–14585 (például).
- Martinek Tamás A. – Fülöp Ferenc (2003): Side-chain Control of Beta-peptide Secondary Structures. *European Journal of Biochemistry*. **270**, 3657–3666.
- Martinek Tamás A. – Mándity I. M. – Fülöp L. – Tóth G. K. – Vass E. – Hollósi M. – Forró E. – Fülöp F. (2006): Effects of the Alternating Backbone Configuration on the Secondary Structure and Self-Assembly of beta-Peptides. *Journal of the American Chemical Society*. **128**, 13539–13544.

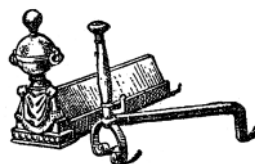
Martinek Tamás A. – Hetényi, A. – Fülöp, L. – Mándity, I. M. – Tóth, G. K. – Dékány, I. – Fülöp, F. (2006): *Secondary Structure Dependent Self-Assembly of β -Peptides into Nanosized Fibrils and Membranes*. *Angewandte Chemie International Edition*. 45, 2396–2400.

Mándity István M. – Wéber E. – Martinek T. A. – Olajos G. – Tóth G.K. – Vass E. – Fülöp F. (2009): *Design of Peptidic Foldamer Helices: A Stereochemical Patterning Approach*. *Angewandte Chemie International Edition*. 48, 2171–2175.

Meierhenrich, Uwe (2008): *Amino Acids and the Asymmetry of Life, Caught in the Act of Formation*. Springer

Pályi Gyula – Zucchi C. – Caglioti L. (eds.) (1999): *Advances in BioChirality*. Elsevier Science, Amsterdam

Rana, Soumendra – Kundub, B. – Durani, S. (2005): *A Small Peptide Stereochemically Customized as a Globular Fold with a Molecular Cleft*. *Chemical Communications*. 207–209. (például) <http://www.rsc.org/Publishing/Journals/CC/article.asp?doi=b413802c>

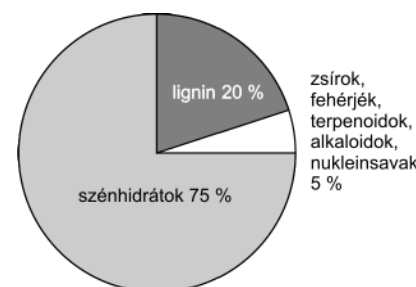


A Földön évente újratermelődő biomassza mintegy 200 milliárd tonna/év tömegűnek becsülhető (Lichtenthaler, 2004). Ennek az anyagmennyiségnek közel 75 %-át szénhidrátok: szénből, hidrogénből és oxigénből felépülő cukorszármazékok teszik ki (1. ábra).

A legnagyobb arányban a cellulóz és a hozzá hasonló, a növények vázanyagát alkotó óriásmolekulák vannak jelen, de számottevő a növényi tápanyag-raktározást szolgáló keményítő is. Ezek a makromolekulák (poliszacharidok) az egyszerű cukrok (monoszacharidok) legelterjedtebb képviselője, a D-glükóz (szőlőcukor) molekuláinak egymáshoz kapcsolódásával épülnek föl. A D-glükóz a fotoszintézis elsődleges terméke, az élő szervezetek többségében pedig az egyik közvetlen energiaforrás, de ha koncentrációja a vérünkben túllépi a szokásos szintet, az cukorbetegséghez vezet. Az egyéb poliszacha-

ridok az élővilág legnagyobb részében (baktériumok, gombák, növények, ízeltlábúak) a sejtfalak alapvető alkotórészei. A szénhidrátok legismertebb, „közkezen forgó” képviselője a (kristály)cukorként megszokott mindennapi édesítőszer, a szacharóz nevű összetett cukor (D-glükózból és D-fruktózból [gyümölcs-cukor] álló diszacharid), melyet a mérsékelt égövön cukorrépből, a (szub)tropusokon pedig cukornádból nyernek ki igen nagy tisztasággal. Mintegy négyötöd részben szénhidrátok keveréke (D-fruktóz ~38 %, D-glükóz ~31 %, maltóz ~7 %, szacharóz ~1–2 %) az ősidők óta ismert és használt méz, amely a fő alkotókon kívül közel 180 egyéb komponenset tartalmaz. A szénhidrátok közvetlen felhasználása, illetve átalakításaik több évszázados, gyakran évezredek múlta tekinthetnek vissza, hogy csak a nagyszámú élelmiszerkészítési eljárást, sörfőzést és borkészítést, papírgyártást, viszkózműselyem-előállítást, szerkezeti- és tüzelőanyagként való felhasználást említsük példaként. Ez a néhány példa mutatja, hogy a különböző szénhidrátszármazékok környezetünkben és az élő szervezetekben milyen elterjedtek, és milyen alapvető szerepet töltenek be.

Gazdag ismereteink vannak a szénhidrátok élő szervezeten belüli átalakulásairól (metabolizmusáról), például a glükóz és más cukrok felépítéséről, lebontásáról, részvételtük-



1. ábra • A biomassza összetétele