

Peptidek, peptidmimetikumok és fémkomplexek ECD és VCD spektroszkópiai vizsgálata

Zárójelentés

1. Bevezetés

A „Peptidek, peptidmimetikumok és fémkomplexek ECD és VCD spektroszkópiai vizsgálata” című, K81175 sz. OTKA-pályázat fő célkitűzése a kiroptikai spektroszkópiai módszerek (ECD, VCD) és molekulamodellezés kombinált alkalmazása a szerves- és biokémiai kutatások során felmerülő térszerkezeti problémák megoldására. Célul tűztük ki továbbá a VCD-spektroszkópia alkalmazhatóságának tesztelését, feltárva a módszer határait, valamint új technikák fejlesztését és kipróbálását.

2011 decemberében sikerült bővíteni kiroptikai műszerparkunkat egy 52 MFt értékű BioTools ChiralRaman-2X típusú Raman optikai aktivitás (ROA) spektrométerrel az ELTE által elnyert KMOP-4.2.1/B-10-2011-0002 pályázat keretéből. A VCD-spektroszkópia kiegészítőjeként a ROA-technika új lehetőséget nyújtott a királis molekulák (jelen projektünk esetében elsősorban diamid modellvegyületek) vizes oldatokban kialakuló térszerkezetének (abszolút konformációjának) felderítésében.

2. A projekt keretében végzett kutatások

2.1. Diamid modellvegyületek spektroszkópiai vizsgálata

A diamid típusú modellvegyületek térszerkezetének spektroszkópiai vizsgálata az α - és β -aminosavegyégek konformációs preferenciájának, az aminosav-oldallánc, valamint oldószer térszerkezetre gyakorolt szerepének tisztázására, a H-kötésekkel stabilizált másodlagos szerkezeti elemek detektálására irányult.

Kutatásaink során hat diamid modellvegyület (Ac-Aaa-NHMe, Aaa: Ala, Phe, Pro, valamint ezek β -homoaminosavat tartalmazó Ac- β -HAaa-NHMe analógjai) előállítására és komplex spektroszkópiai vizsgálatára került sor (FTIR, VCD, ECD, egyes esetekben Raman, ROA). A modellvegyületek teljes körű spektroszkópiai vizsgálatát több esetben is oldékonysági és spektrumszámítási problémák is nehezítették, ezért nem minden vegyületről sikerült minden oldószerben (FTIR, VCD: ACN- d_3 , DMSO- d_6 , DCM; ECD: ACN, H₂O, TFE, Raman és ROA: H₂O), spektrumot felvenni, illetve a mért és számolt spektrumokat interpretálni.

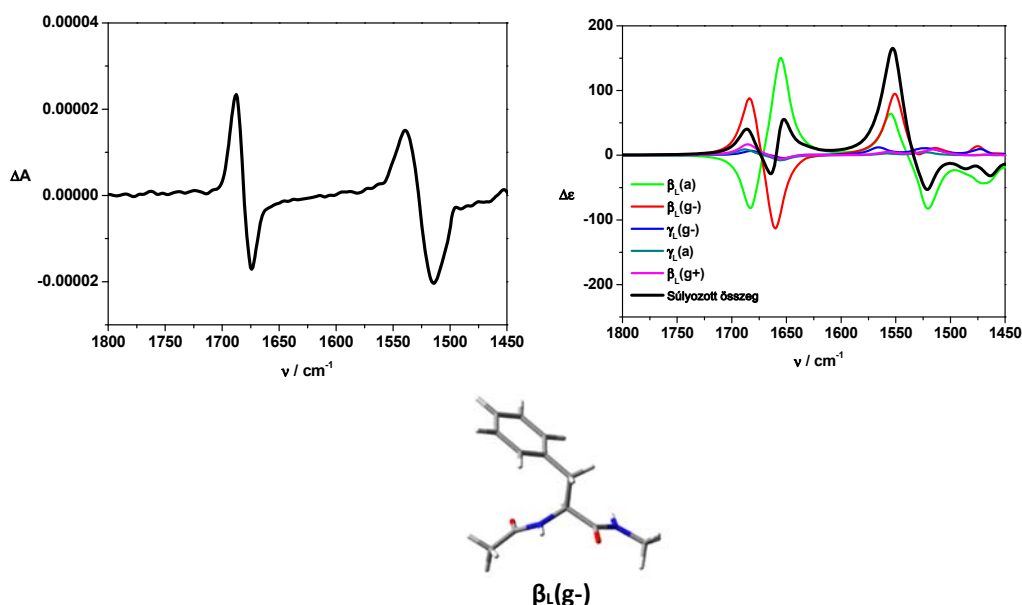
A diamid modellvegyületek előállítása Boc-védett α -L-aminosavból kiindulva történt, az oldatfázisú peptidszintézis egyszerű, ismert módszereit alkalmazva. A β -homoaminosavak előállítása két lépésben történt, Arndt-Eistert lánchosszabbítást követő Wolff-átrendeződéssel. A termékek tisztaságvizsgálata és azonosítása RP-HPLC és ESI-MS segítségével történt.

A modellvegyületek szerkezetvizsgálata kiterjedt a molekulák konformációanalízisére és spektrumok számítására, valamint oldat- és szilárdfázisú spektroszkópiai vizsgálatára. A számításokat Gaussian 09 kvantumkémiai szoftvercsomaggal végeztük. Az IR- és VCD-spektrumok számítása B3LYP/6-31++G** elméleti szinten, míg az ECD-spektrumok számítása TD-DFT módszerrel, B3LYP/6-311++G** elméleti szinten történt, ugyanezt a B3LYP/6-311++G** elméleti szintet alkalmaztuk a Raman- és ROA-spektrumok számításánál is. A konformerek eloszlására gyakorolt oldószerhatás feltérképezésére a számításokat IEF-PCM oldószermodellrel végeztük a mérések során használt oldószerekre. Az ECD-spektrumok számítását csak acetonitril (ACN) oldószermodellben végeztük el.

Az FTIR- és VCD-spektrumok felvétele Bruker Equinox55/PMA37 típusú spektrométerrel, az oldatfázisú ECD-spektrumok felvétele Jasco J-810 vagy J-815 (a szilárdfázisú spektrumok esetén) spektropolariméterrel, a Raman- és ROA-spektrumok BioTools ChiralRaman-2X spektrométerrel történt.

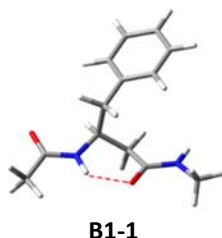
2.1.1. Fenilalanin- és β -homofenilalanin-származékok vizsgálata

A Phe-származékok diklórmétánban (DCM) rosszul oldódnak, ezért az FTIR- és VCD-spektrumokat DMSO- d_6 és ACN- d_3 oldószerben vettük fel. Az α -Phe-származéknál mindkét oldószerben a mért és számolt VCD-spektrumok az Amid II (1570-1500 cm^{-1}) tartományban teljesen megegyeznek, míg az Amid I tartományban (1700-1600 cm^{-1}) eltérés látható (**1. ábra**). Az eltérés magyarázata lehet a rezgési módusok nem robusztus jellege, egyes esetekben ugyanis a számított VCD sáv előjele megfordulhat a körülményekben bekövetkező legkisebb változásra is, például kölcsönhatás kialakulása az oldószer molekulával, vagy változás a számítási módszerben. Ezeket perturbációra érzékeny VCD rezgési módusokat nem robusztusnak nevezzük.^{1,2} Egy másik lehetséges magyarázat az eltérésre, hogy az oldószerrel kialakult speciális kölcsönhatás miatt előfordulhat, hogy nem a PCM oldószermodellel számított energiasorrendnek megfelelő legstabilabb konformer a domináns, hanem egy nagyobb energiájú konformer. Mindkét oldószerben ez a nagyobb energiájú konformer a nyújtott szerkezetű $\beta_L(g^-)$, melynek számított spektruma jó egyezést mutat a mért spektrummal (**1. ábra**).



1. ábra. Az Ac- α -Phe-NHMe ACN- d_3 oldószerben mért (bal) és számolt (jobb) VCD-spektruma, valamint a $\beta_L(g^-)$ konformer szerkezete

A β -HPhe-származék mért és számolt VCD-spektrumai között is fennáll az eltérés az Amid I tartományban. Ebben az esetben is az adott módusok nem robusztus jellegéből adódik az eltérés. Az Ac- β -HPhe-NHMe domináns konformere mindkét oldószerben egy C_6 H-kötéses szerkezetű konformer (**2. ábra**).



2. ábra. Az Ac- β -HPhe-NHMe legkisebb energiájú konformerének szerkezete

¹ Gábor Magyarfalvi, György Tarczay, Elemér Vass, „Vibrational Circular Dichroism” *WIREs Comp. Mol. Sci.* 2011, **1**, 403-425.

² Tarczay György, Vass Elemér, Góbi Sándor, Magyarfalvi Gábor, „Rezgési optikai aktivitás – Abszolút konfiguráció és konformáció meghatározása” *Magyar Kémiai Folyóirat*, 2013, **119**, 53-66.

Az α - és a β -HPhe származékok ECD-spektrumai mindhárom oldószerben egyezést mutatnak. A mért spektrumokon a domináns aromás jelek átfednek az amid kromofor sávjaival, ezért a számolt spektrumok interpretálása nehézségeket okoz.

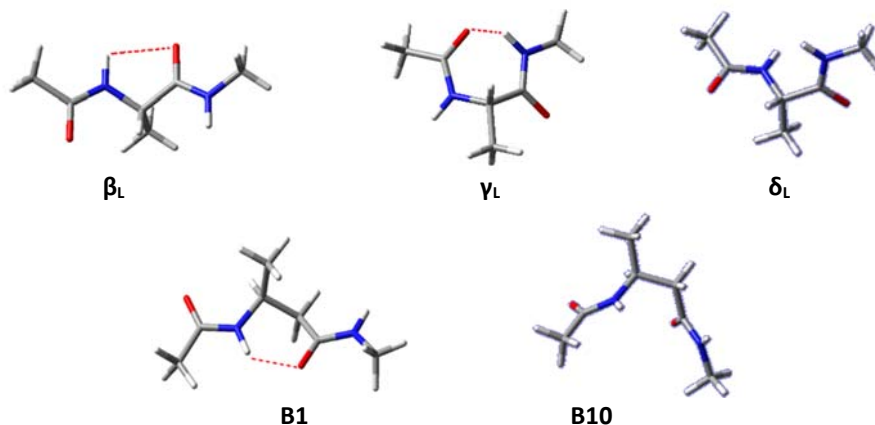
Sor került a Phe-származékok szilárdfázisú ECD spektroszkópiai vizsgálatára is, azonban a számolt és mért spektrumok megfeleltetése további vizsgálatokat igényel.

A Phe-származékok vízben rosszul oldódnak, ezért a ROA- és Raman-spektroszkópiai mérésekre nem került sor.

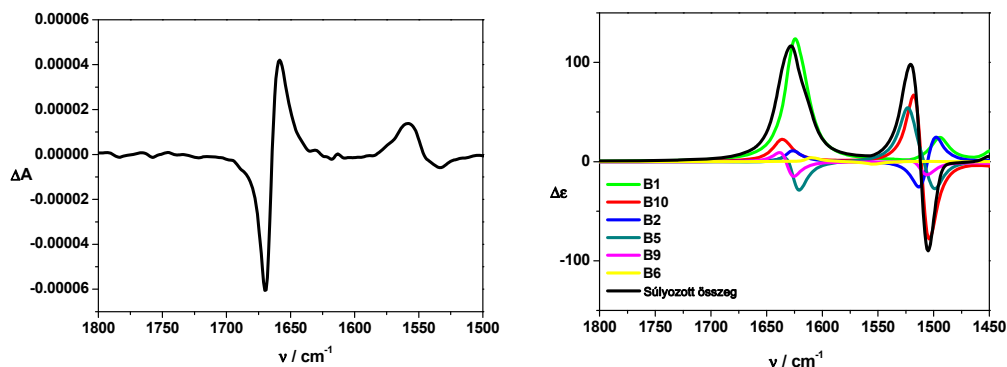
2.1.2. Alanin- és β -homoalanin-származékok szerkezetvizsgálata

Korábbi vizsgálatok szerint az Ac- α -Ala-NHMe DMSO közegben C_5 és C_7 H-kötéses kanyarszerkezetet alakít ki (β_L , γ_L , δ_L). Az Ac- β -HAla-NHMe esetén a C_6 H-kötéses és a nyújtott konformerek dominálnak DMSO-ban (3. ábra).

A β -HAla diamid modellvegyület DMSO oldószermodellel végzett konformációanalíziséhez az irodalomban közölt, vákuum állapotra számított geometriákból tovább optimalizáltuk a szerkezeteket és kiszámítottuk az elméleti spektrumokat. A mért és számított VCD-spektrumok az Amid II tartományban jó egyezést mutatnak, azonban Amid I tartományban nagyfokú eltérés tapasztalható, ami az Amid I módusok nem robusztus jellegével magyarázható (4. ábra)



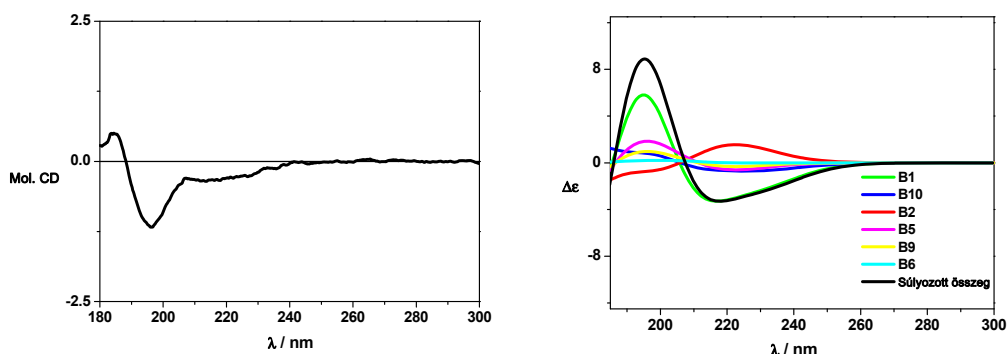
3. Ábra. Az Ac- α -Ala-NHMe (β_L , γ_L , δ_L) és az Ac- β -HAla-NHMe (B1, B10) domináns konformereinek szerkezete DMSO-ban



4. ábra. Az Ac- β -HAla-NHMe DMSO- d_6 oldószerben mért (bal) és számolt (jobb) VCD-spektruma

Az α - és a β -HAla származékok ECD-spektrumai vízben és acetonitrilben egyezést, TFE-ben nagy eltérést mutatnak. Az Ac- β -HAla-NHMe ACN-ben mért és számolt spektruma (5. ábra) sávalakban egyezést mutat, a sávok helye szempontjából a számolt spektrum kiscsök vörös eltolódást mutat a mért spektrumhoz képest. A mért spektrum és a B1-konformer spektrumának sávalakbéli hasonlóságából arra következtethetünk, hogy a B1-konformer ACN-ben is dominál. ECD-

spektroszkópiai vizsgálatok történtek szilárdfázisban (KCl) is. A mért spektrumok összevetése a számolt spektrumokkal további terveink között szerepel.



5. ábra. Az Ac-β-HAla-NHMe ACN-ben mért (bal) és számolt (jobb) ECD-spektruma

Az előzőek során tárgyalt, nyílt láncú aminosavegységeket tartalmazó diamid modellvegyületeken végzett kutatásaink eredményeit hazai és nemzetközi konferenciákon poszterek és előadások formájában ismertettük.^{3,4,5,6}

2.1.3. Prolin- és β-homoprolin-származékok szerkezetvizsgálata

A diamid modellvegyületek közül az Ac-Pro-NHMe és Ac-β-HPro-NHMe vegyületeket sikerült a legrészletesebb vizsgálatnak alávetni. Ezeknél a modelleknél FTIR, oldat- és szilárdfázisú ECD és VCD, vizes közegben kivitelezett Raman- és ROA-spektroszkópiai, valamint röntgenkristallográfiás szerkezetvizsgálat is történt, melyek – kvantumkémiai számításokkal kiegészítve – bizonyították az α-Pro és β-HPro diamid rendszerek szignifikánsan eltérő konformációs viselkedését különböző környezetekben.⁷

A röntgenkristallográfiái adatok szerint kristályos állapotban az egyedi Ac-Pro-NHMe molekulák geometriája megfelel egy az α-helikális konformációhoz közel álló α_L - konformerének. Vizsgálataink alapján poláris oldószerekben (ACN, DMSO) és vizes oldatban szintén ez a legstabilabb, legnagyobb populációval rendelkező konformer. A vizsgáltak közül a legkevésbé poláris oldószerben (DCM) a legnagyobb populációval rendelkező konformer a C_7 intramolekuláris H-kötéssel stabilizált γ -kanyar-szerkezet (γ_L). Megjegyzendő, hogy a poláris oldószerekben legstabilabb és kristályszerkezetben azonosított α_L - konformer a számítások szerint vákuumban nem stabil, geometriai optimalizáció során ugyanis a γ_L - konformerbe (γ -kanyar) konvergál.

Az Ac-β-HPro-NHMe röntgenkristallográfiával kapott geometriája nem egyezik sem az oldatfázisban, sem pedig az alacsony hőmérsékletű Ar- és Kr-mátrixban korábban valószínűsített konformerekével. Kristályban az egyes molekulákat intermolekuláris N–H...O hidrogénkötések tartják

³ Knapp Krisztina „α- és β-homo-aminosavak származékai, mint spektroszkópiai modellvegyületek” Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2010. október 25-27. (Előadás)

⁴ Knapp Krisztina, Hollósi Miklós, Vass Elemér, Majer Zsuzsa „A biológiailag jelentős kanyarszerkezetek vizsgálata diamid modellvegyületekkel” MKE I. Nemzeti Konferencia, Sopron, 2011. május 22-25. (Poszter)

⁵ Knapp Krisztina, Majer Zsuzsa, Hollósi Miklós, Vass Elemér „Kanyarszerkezetek kiroptikai spektroszkópiai jellemzése modellvegyületekkel” MTA Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés, Balatonszemes, 2011. szeptember 19-21. (Előadás)

⁶ Krisztina Knapp, Marcin Górecki, Miklós Hollósi, Elemér Vass, Zsuzsa Majer „Chiroptical spectroscopic investigation on diamide peptide models” Peptides 2012, Proceedings of the Thirthy-Second European Peptide Symposium, September 2-7 2012 – Athens, Greece, pp 676-677.

⁷ Krisztina Knapp, Marcin Górecki, Jadwiga Frelek, Roman Luboradzki, Miklós Hollósi, Zsuzsa Majer, Elemér Vass „Comprehensive Chiroptical Study of Proline-Containing Diamide Compounds” *Chirality* 2014, **26**, 228-242. (2014)

össze, szálszerű struktúrát alkotva, az Ac- β -HPro amidkötés konformációja *transz*. ROA-spektroszkópiai mérések és kvantumkémiai számítások szerint az Ac- β -HPro-NHMe esetében a vizes közeg erősen indukálja az N-terminálison *cisz* amidkötéseket tartalmazó konformerek kialakulását, ellentétben az α -aminosavegységet tartalmazó Ac-Pro-NHMe diamiddal. Vízben a legstabilabb konformer (Cc-) *cisz* Ac- β -HPro peptidekötést tartalmaz, ugyanezt az C₈ intramolekuláris H-kötést kialakítani nem képes konformert találtuk dominánsnak DMSO és ACN oldatban is.

Fontos eredménynek tartjuk, hogy szilárd fázisban (KCl) mért ECD-spektrumok jó egyezés adtak a röntgenkristallográfiával kapott geometriákra TD-DFT-módszerrel számolt spektrumokkal, tehát egyetlen szerkezethez rendelhetők. Ez sajnos, nem mondható el a szilárdfázisú VCD spektrumok esetén, itt fel kell tételeznünk, hogy spektrumban nem az egyedi molekulák, hanem a kristályban levő szupramolekuláris struktúra sajátosságai tükröződnek. Ez azt is jelenti, hogy flexibilis diamidok szilárdfázisú VCD-spektrumának értelmezése kellő körültekintést igényel.

A prolinegység egyedi, ciklusos jellege lokális merevséget kölcsönöz az α -aminosavaból felépülő peptidek gerinckonformációjának. Kimutattuk, hogy az Ac-Pro-NHMe *transz* amidkötéses formája dominál minden közegben. Az Ac- β -HPro-NHMe megnövekedett flexibilitása megmagyarázza konformációs eltérését az Ac-Pro-NHMe modellhez viszonyítva. Eredményeink rámutattak arra, hogy az α -Pro helyettesítése β -HPro egységgel a peptidkonformáció jelentős változását indukálhatja, melyek egyedi másodlagos és harmadlagos szerkezeti elemekhez vezethetnek, így a β -HPro fontos peptidmimetikum elemnek tekinthető.

2.1.4. 2-Amino-ciklopentán- és 2-amino-ciklohexánkarbonsav-egységeket (Acpc, Achc) tartalmazó modellvegyületek vizsgálata

Jelen projekt közvetlen előzményeként a Bielefeldi Egyetemmel együttműködve több, peptidmimetikumnak tekinthető *transz*-(1*S*,2*S*)-2-amino-ciklopentán- (*transz*-Acpc) vagy *transz*-(1*S*,2*S*)-2-aminociklohexán-karbonsav (*transz*-Achc) egységeket tartalmazó ciklusos penta- és -hexapeptidet vizsgáltuk VCD- és ECD-spektroszkópiával, valamint NMR-rel.⁸⁹ Az elsődleges cél a *transz*-Acpc/Achc egység térszerkezet-indukáló hatásának felderítése, a várhatóan létrejövő C₁₁ H-kötéssel stabilizált *pseudo*- β -kanyarok kimutatása, valamint a VCD-spektroszkópián és NMR-en alapuló szerkezetvizsgálat hatékonyságának összehasonlítása volt. Mivel az eredmények alapján úgy tűnt, hogy ezek a nem-természetes aminosavegységek jelentős mértékben determinálják a kialakuló VCD-spektrum jellegét, célul tűztük ki az Ac-*cisz*- ill. Ac-*transz*-Acpc/Achc-NHMe típusú diamid modellvegyületek kiroptikai spektroszkópiai vizsgálatát. A diamid modellvegyületek szintézisének fentebb leírt módszereket alkalmazva többtíz mg mennyiségben előállítottuk az Ac-*transz*-(1*S*,2*S*)-Acpc-NHMe, Ac-*transz*-(1*S*,2*S*)-Achc-NHMe, Ac-*cisz*-(1*R*,2*S*)-Acpc-NHMe és Ac-*cisz*-(1*R*,2*S*)-Achc-NHMe modellvegyületeket. Sajnos e vegyületek oldhatósága rendkívül alacsonynak bizonyult a VCD-spektroszkópiában használatos oldószerekben, ezért nem sikerült értékelhető spektrumot kapni. Az Acpc-származékok (*cisz*- és *transz* egyaránt), valamint a *cisz*-Achc-származék vízben jól oldódott, így e diamid modellekről jó minőségű Raman- és ROA-spektrumokat sikerült felvenni. A konformációanalízis, a spektrumok részletes kiértékelése jelenleg folyamatban van.

⁸ Elemér Vass, Ulf Strijowski, Katrin Wollschläger, István M. Mándity, Gábor Szilvágyi, Michał Jewgiński, Katharina Gaus, Soledad Royo, Zsuzsa Majer, Norbert Sewald, Miklós Hollósi „VCD studies on cyclic peptides assembled from L- α -amino acids and a *trans*-2-aminocyclopentane- or *trans*-2-aminocyclohexane carboxylic acid” *J. Peptide Sci.* 2010, **16**, 613–620. – közvetlenül jelen projekt indulása előtt, de annak témakörében született

⁹ Hollósi Miklós, Knapp Krisztina, Majer Zsuzsa, Szilvágyi Gábor, Vass Elemér „A VCD-spektroszkópia alkalmazása peptidek, peptidmimetikumok és királis átmenetifém-komplexek térszerkezetének felderítésében” *Magyar Kémiai Folyóirat* 1012, **118**, 145-150.

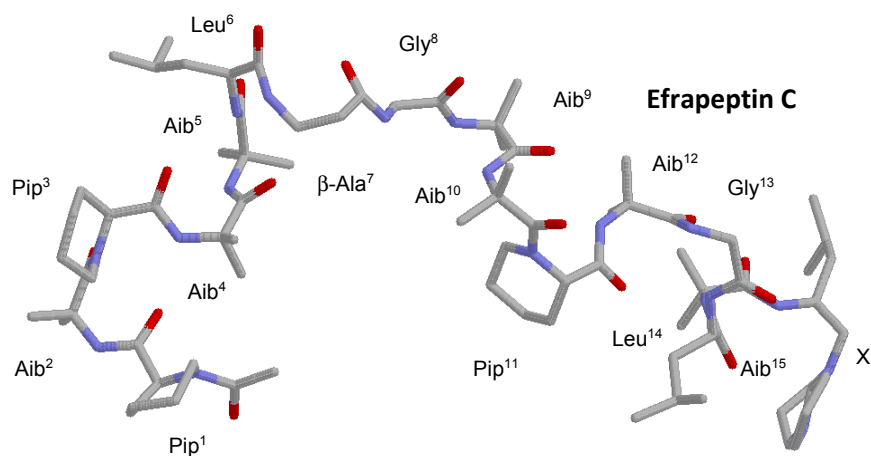
2.2. Egyéb peptidek, peptidmimetikumok spektroszkópai vizsgálata

2.2.1. β -Kanyarszerkezetek kimutatása VCD-spektroszkópiával

A VCD-spektroszkópia egyik alkalmazási területe a kanyarszerkezetek kimutatása, megkülönböztetése és spektroszkópai sajátosságainak tisztázása ciklopeptid modellvegyületeken végzett vizsgálatok segítségével. Mi az antamanid-analóg *ciklo*(Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly) peptid VCD-spektroszkópai vizsgálatát végeztük DMSO- d_6 oldatban. Korábbi NMR-adatok alapján várható volt, hogy kristályszerkezetéhez hasonlóan oldatban is aszimmetrikus szerkezet jön létre, melyben két egymást követő amidkötés is *cisz* konformációjú (Gly³-Pro⁴ és Pro⁴-Pro⁵), a molekula másik felében (a Pro¹ és Pro² körül) pedig C₁₀ kötessel stabilizált β -kanyar található. E szerkezetet sikerült minden kétséget kizáróan igazolni a mért és számított VCD-spektrumok összehasonlításával, továbbá igazolni, hogy a spektrum Amid I tartományának alsó felében jelentkező pozitív couplet-szerű sávpár (pozitív VCD-sáv 1635 cm⁻¹-nél és negatív sáv 1650 cm⁻¹-nél) megjelenéséért az I típusú β -kanyart kialakító amidcsoportok felelősek.¹⁰

2.2.2. Efrapeptinek konformációjának VCD-spektroszkópai vizsgálata

Az efrapeptinek családját a *Tolypocladium niveum* gomba által termelt F₁-ATPase inhibitor peptid antibiotikumok képezik, melyek ígéretes tumorelles, maláriaellenes, valamint rovarölő hatással rendelkeznek. Felépítésükben gyakoriak a C α -dialkil aminosavak (Aib, Iva, Acc), emellett tartalmaznak egy β -alanin, valamint több pipekolinsav (Pip) egységet, C-terminálisuk pedig egy speciális kationos heterociklusos csoporttal van lezárva.



6. ábra. Az Efrapeptin C szerkezete

A Bielefeldi Egyetem Prof. Dr. Norbert Sewald által vezetett csoportjával együttműködve az efrapeptin C (6. ábra), valamint több, módosított aminosav-szekvenciájú analógja ([D-Pip¹¹]efrapeptin C [Pro^{1,3,11}]efrapeptin C, [MeAla^{1,3}]efrapeptin C és [MeAla^{1,3,11}]efrapeptin C) szerkezetét vizsgáltuk VCD-

¹⁰ Miklós Hollósi, Elemér Vass, Gábor Szilvágyi, Andreja Jakas, Ilona Laczkó „Structure analysis of proteins, peptides and metal complexes by vibrational circular dichroism” ARKIVOC 2012, 5, 291-300.

spektroszkópiával.^{11,12} A peptidek szintézise, kiegészítő NMR- és ECD-spektroszkópiai vizsgálata a Bielefeldi Egyetemen történt. Mind az efrapeptin C, mind pedig a D-Pip vagy Pro egységekkel módosított analógjai esetében megállapítottuk, hogy szerkezetük döntően helikális. Az efrapeptin C VCD-spektruma arra utal, hogy diklórmétán oldatban döntően 3_{10} -hélix szerkezetű, mely H-kötéseket destabilizáló dimetil-szulfoxidban is nagyrészt megőrződik. A VCD-kísérletek igazolták, hogy azon analógok esetén, ahol a gyűrűs aminosavegység (Pip vagy Pro) cseréje történt MeAla egységre, a 3_{10} -helikális konformáció részlegesen megmaradt, annak ellenére, hogy az N-metil-L- α -aminosav egység sokkal flexibilisebb a Pro vagy Pip egységnél (φ -100° és +60° között változhat).

2.2.3. Reumatoid arthritisz specifikus biotinilezett peptidkonjugátumok szerkezetvizsgálata

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoporttal együttműködve ECD-spektroszkópián alapuló térszerkezet-vizsgálatokat végeztünk a reumatoid arthritisz specifikus autoantitest felismerésben szerepet játszó citrullinezett vagy arginin-tartalmú filaggrin epitóp peptideken, valamint ezek N- vagy C-terminálison biotinilezett konjugátumain. A vizsgálatok vizes vagy trifluoetanolos oldatban történtek és kiterjedtek mind a teljes epitóp régióra ($^{306}\text{SGQESTXGXGXSGRSGSGS}^{324}$, X = Cit), mind pedig a régió közepén található minimális epitóp pentapeptidre ($^{311}\text{TXGRS}^{315}$), illetve ezek konjugátumaira. Az ECD-spektroszkópiai adatok alapján az arginin/citrullin csere nem okozott lényeges konformációváltozást a peptidkonjugátumokban, ezzel szemben a biotinrészlet jelenléte és N- vagy C-terminális helyzete erőteljes hatással volt a minimális epitóp pentapeptidek térszerkezetére, míg a teljes epitóp régióknak megfelelő 19-tagú peptidek másodlagos szerkezetét nem módosította. A C-terminálison biotinnal konjugált minimális epitóp pentapeptid esetében a vízben mért ECD-spektrum PPII konformáció és/vagy strukturálatlan másodlagos szerkezeti elemek keverékére utalt, ezzel szemben az N-terminálison konjugált származék esetében jelentős mennyiségű β -kanyar (β I-III) szerkezetre, és ez jól korrelált a biológiai vizsgálatok eredményével.¹³

2.2.4. Amiloid prekursor fehérje (APP) 667-676 fragmensének térszerkezetvizsgálata kiroptikai módszerekkel

A Vanderbilt Egyetem (Nashville, TN, USA) Prasad L. Polavarapu professzor által vezetett kutatócsoportjával együttműködve ECD-spektroszkópiával vizsgáltuk az Alzheimer-kór kialakulásában szerepet játszó amiloid prekursor fehérje 667–676 szakaszának megfelelő Ac-Ser-Glu-Val-Lys-Met-⁶⁷²Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-NH₂ peptid (APP₆₆₇₋₆₇₆), valamint 672-es pozícióban D-Asp vagy iso-Asp aminosavakkal módosított származékainak térszerkezetét. E vizsgálatokat a Vanderbilt Egyetemen VCD-spektroszkópiai mérésekkel egészítették ki. A spektroszkópiai adatok szerint az APP₆₆₇₋₆₇₆ vízben flexibilis PPII-szerű, dimetil-szulfoxidban pedig tipikus PPII-hélix konformációval jellemezhető, ezzel szemben trifluoetanolban lényegében α -helikálissá válik. Vízben és dimetil-szulfoxidban az ⁶⁷²Asp / D-⁶⁷²Asp / iso-⁶⁷²Asp csere nem okozott jelentős térszerkezet-változást, trifluoetanolban az α -hélix aránya jelentősen csökkent β -redő és β -kanyar szerkezetek javára. Az eredmények arra utalnak, hogy az APP₆₆₇₋₆₇₆ peptidszakasz meglehetősen flexibilis, környezeti hatásra jelentősen megváltozhat

¹¹ Sven Weigelt, Thomas Huber, Frank Hofmann, Micha Jost, Markus Ritzefeld, Burkhard Luy, Christoph Freudenberger, Zsuzsanna Majer, Elemér Vass, Jörg-Christian Greie, Lavinia Panella, Bernard Kaptein, Quirinus B. Broxterman, Horst Kessler, Karlheinz Altendorf, Miklós Hollósi, Norbert Sewald „Synthesis and conformational analysis of efrapeptins” *Chem. Eur. J.* 2012, **18**, 478-487.

¹² Anita Dutt Konar, Elemér Vass, Miklós Hollósi, Zsuzsa Majer, Gerhard Grüber, Katrin Frese, Norbert Sewald, „Conformational properties of secondary amino acids: Replacement of pipecolic acid by N-methyl-L-alanine in efrapeptin C”, *Chem. Biodivers.* 2013, **10**, 942-951.

¹³ Fruzsina Babos, Eszter Szarka, György Nagy, Zsuzsa Majer, Gabriella Sármay, Anna Magyar, Ferenc Hudecz „Role of N- or C-Terminal Biotinylation in Autoantibody Recognition of Citrullin Containing Filaggrin Epitope Peptides in Rheumatoid Arthritis” *Bioconjugate Chem.* 2013, **24**, 817-827.

térszerkezete.¹⁴ Ez az információ segítheti az Alzheimer-kórhoz vezető folyamatokban szerepet játszó β -szekretáz – APP_{667–676} szubsztát közötti kölcsönhatás megértését.

2.3. Aminosavak ródium-komplexeinek szintézise és szerkezetvizsgálata kiroptikai spektroszkópai módszerekkel

A dinukleáris ródiumkomplexek rendkívül sokoldalú vegyületek, ebből következően nagy érdeklődésre tettek szert. Elmondható, hogy népszerűségükhöz a kimagasló stabilitásuk, jellegzetes szerkezetük és katalitikus aktivitásuk nagyban hozzájárult. A mai napig e vegyületek fő alkalmazási területe a katalízis, de biológiai (elsősorban potenciális tumorelles) hatásuk miatt is érdekesek. A 80-es évektől kezdve igen intenzív kutatás folyik ilyen fémkomplexek előállítására, szerkezetvizsgálatára valamint katalitikus hatásuk és biológiai hatásuk tesztelésére (az alkalmazott királis ligandumok általában karboxilátok, védett aminokarboxilátok, amidátok, stb.).

Mind biológiai, mind pedig potenciális katalizátorhatásuk miatt rendkívül fontos a fémkomplex oldatbeli térszerkezetének ismerete. A királis átmenetifém-komplexek oldatbeli térszerkezetének illetve konformációs viszonyainak feltérképezésére kiváló lehetőséget nyújtanak a kiroptikai spektroszkópai technikák (elsősorban ECD, VCD), együttes alkalmazásuk kvantumkémiai számításokkal kiegészítve igen hatékony és megbízható módszer a molekulák abszolút konfigurációjának illetve konformációjának meghatározására. Kutatásaink során aminosav alapú kétmagvú ródiumkomplexek előállítását és kiroptikai szerkezetvizsgálatát végeztük.

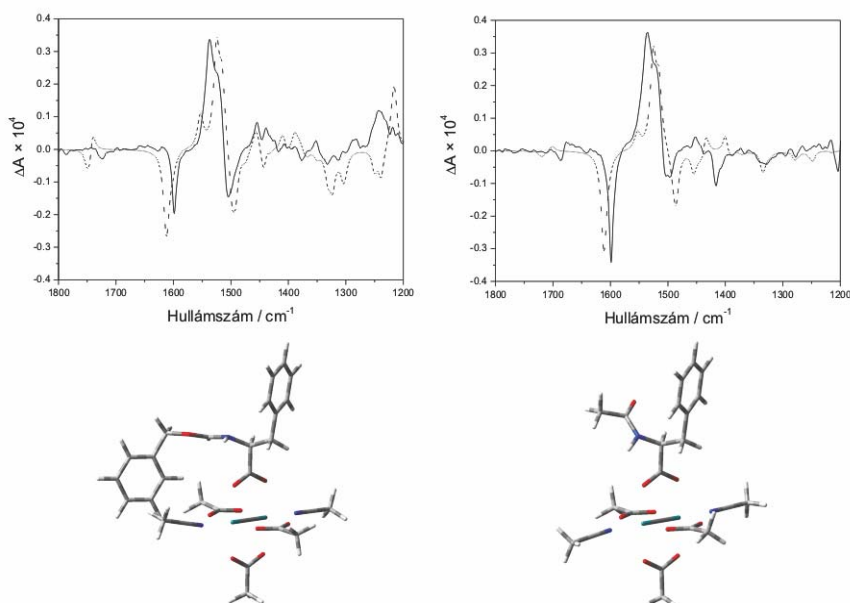
2.3.1. Királis ligandumként *N*-védett aminosavak tartalmazó ródiumkomplexek

Jelen pályázat keretében végzett kutatómunka közvetlen előzményeként védett aminosavat tartalmazó ródiumkomplexekeket állítottunk elő diródium(II)-tetraacetátból kiindulva, melynek 4 acetátja lecserélhető az aktuális királis ligandumra. E komplex vegyületek esetében a királis aminosavszármazék kétfogú karboxilát ligandumként kötődik a fémcentrumhoz. Ligandumként acetil-(Ac) vagy karbobenziloxi-(Cbz) védőcsoportot tartalmazó *S*-fenilalanint alkalmaztunk. A különböző szubsztitúciós fokú ródiumkomplexekeket sikeresen izoláltuk fordított fázisú oszlopkromatográfiás eljárással. A vegyületek oldatfázisú szerkezetét kiroptikai módszerekkel (ECD, VCD spektroszkópia) derítettük ki, amelyeket DFT szintű számítások segítségével támasztottunk alá. Megállapítottuk, hogy az ilyen típusú komplexek esetében az *N*-védett aminosav ligandum az acetát helyére ekvatoriális helyzetben épül be, karboxilátcsoportjával áthidalt módon kapcsolódik a Rh(II)₂ maghoz (**7. ábra**).¹⁵ Acetonitril oldatban a Rh(II)₂-komplex szabad axiális pozícióba oldószermolekulák koordinálnak.

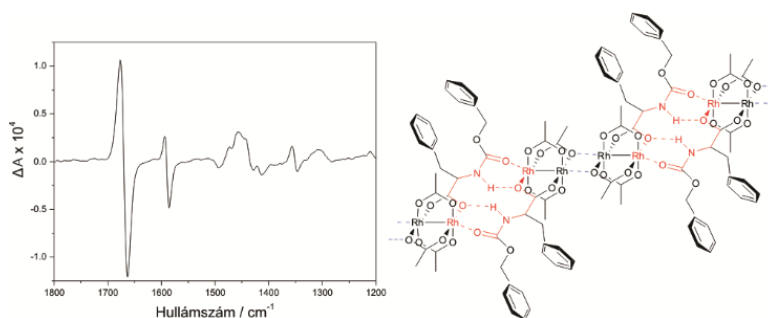
Kloroformban vizsgálva a vegyületek VCD-spektruma drasztikusan megváltozik és nem írható le az önálló komplexek elméleti spektrumával. Mindez megmagyarázható, ha feltételezzük, hogy intermolekuláris kölcsönhatás jön létre az uretáncsoport karbonil oxigénje és egy szomszédos komplexmolekula Rh-atomja között a betöltetlen axiális pozícióban (a kloroform az acetonitrillel ellentétben nem koordinálódik a Rh-hoz, ezért axiális pozíciók szabadok), és az így kialakult dimerek végül szupramolekuláris komplexként stabilizálódnak a **8. ábrán** bemutatott koordinációs séma szerint.⁸

¹⁴ Ganesh Shanmugam, Prasad L. Polavarapu, Emma Láng, Zsuzsa Majer „Conformational analysis of amyloid precursor protein fragment containing amino acids 667–676, and the effect of D-Asp and iso-Asp substitution at Asp672 residue” J. Struct. Biol. (2012) 177: 621-629

¹⁵ Gábor Szilvágyi, Zsuzsa Majer, Elemér Vass, Miklós Hollósi, „Conformational Studies on Chiral Rhodium Complexes by ECD and VCD Spectroscopy” Chirality 2011, **23**, 294-299.



7. ábra. A $\text{Rh}_2(\text{O-Phe-Cbz})_1(\text{OAc})_3$ (bal) és $\text{Rh}_2(\text{O-Phe-Ac})_1(\text{OAc})_3$ (jobb) acetonitril- d_3 oldatban mért (folytonos vonal) és számított (szaggatott vonal) VCD-spektruma, valamint legkisebb energiájú konformereinek szerkezete.

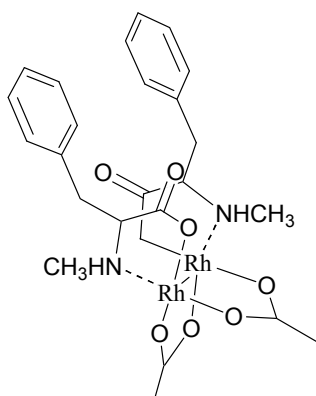


8. ábra. A $\text{Rh}_2(\text{O-Phe-Cbz})(\text{OAc})_3$ komplex kloroform- d oldószerben mért VCD-spektruma, valamint a kloroformban kialakuló szupramolekuláris asszociátum lehetséges szerkezete.

2.3.2. Nem védett aminosavakat tartalmazó királis ródiumkomplexek előállítás és szerkezetvizsgálata

Az előző pontban említett komplex vegyületekkel szemben itt a ligandum koordinációs lehetőségei a dinukleáris fémcentrumhoz a primer vagy szekunder aminocsoport jelenlétével megnövekedtek. Királis és akirális aminosavak felhasználásával királis diródiumkomplexeket állítottunk elő. Királis ligandumként *N*-metil-*R*-fenilalanint, valamint *S*- és *R*-fenilalanint, -prolint, -pipekolinsavat, -fenilglicint, -valint, akirális ligandumként pedig glicint és metilalanint (2-amino-izobutánsavat) alkalmaztunk. A reakcióban a kétszeresen szubsztituált $[\text{Rh}_2(\text{aminokarboxilát})_2(\text{OAc})_2]$ termékek keletkeztek 30-65 % közötti izolált termeléssel. E komplexekben az aminosav ligandumok a karboxilátcsoport egyik oxigénatomjával illetve az aminocsoport nitrogénjével kelátosan koordinálódtak a dinukleáris fémcentrumhoz (**9. ábra**), amit részletes kiroptikai, valamint kiegészítő NMR-vizsgálatokkal is bizonyítottunk.¹⁶

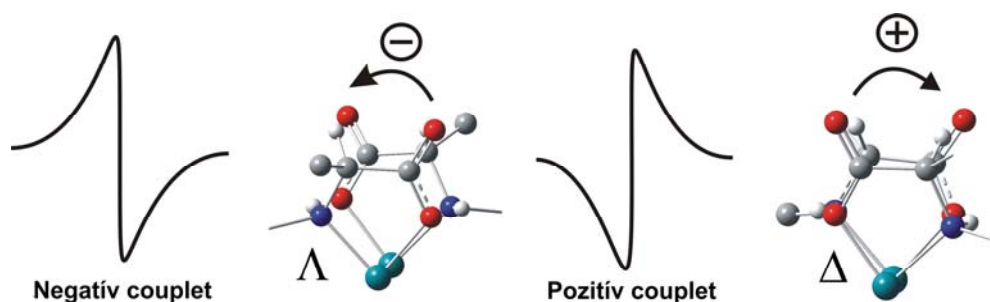
¹⁶ Zsuzsa Majer, Gábor Szilvágyi, László Benedek, Antal Csámpai, Miklós Hollósi, Elemér Vass „Chelate Structure of a Dirhodium–Amino Acid Complex Identified by Chiroptical and NMR Spectroscopy” *Eur. J. Inorg. Chem.* 2013, 3020-3027.



9. ábra. A $\text{Rh}_2(\text{OAc})_2(\text{O-R-Phe-NHMe})_2$ komplex kelátos szerkezete

A ligandumok koordinációja királis elrendeződéshez vezet, így a vegyületek inherensen is királisak. Adott kiralitású aminosavból (*S* vagy *R*) csak egy adott diasztereomer komplex képződött. *S*-aminosavakból $[\Delta\text{-Rh}_2(\text{aminokarboxilát})_2(\text{OAc})_2]$ komplexek, míg az *R*-aminosavakból $[\Lambda\text{-Rh}_2(\text{aminokarboxilát})_2(\text{OAc})_2]$ komplexek képződtek. A prolin volt ez egyetlen kivétel, ahol *S*-prolinból Λ illetve *R*-prolinból Δ konfigurációjú komplex képződött. A kiralitáscentrummal nem rendelkező ligandumok (glicin, metilalanin) esetében racém komplexhez $[\Lambda/\Delta\text{-Rh}_2(\text{aminokarboxilát})_2(\text{OAc})_2]$ jutottunk, amit királis HPLC segítségével sikerült enantiomerjeire szétválasztani. ECD- és VCD-spektroszkópia segítségével végeztük el a vegyületek szerkezetvizsgálatát, amely több részből állt. Először a lehetséges geometriai izomerek eldöntése volt a kérdés, hiszen a két ligandum különféleképpen tud koordinálódni a fémcentrumhoz, illetve a ligandumok egymáshoz viszonyított relatív helyzete sem elhanyagolható kérdés. A szerkezetvizsgálatnak a lehetséges konformerek kiroptikai módszerekkel való feltérképezése is részét képezte.

E vegyületek esetében a koordinálódó aminokarboxilát ligandum antiszimmetrikus karboxilát rezgése csatolnak és a VCD-spektrumban egy intenzív pozitív vagy negatív „couplet”-et adnak (excitoncsatolás), melynek előjele a vegyület abszolút konfigurációjától (Λ vagy Δ) függ (10. ábra).¹⁷ Az excitonkiralitás módszerével gyorsan és hatékonyan meghatározható az ilyen típusú vegyületek abszolút konfigurációja, anélkül, hogy DFT számításokat végeznénk.



10. ábra. A kidolgozott VCD excitonszabály sematikus ábrázolása (csak a Rh_2 maghoz kelátosan kapcsolódó aminosavakat tüntettük fel)

¹⁷ Gábor Szilvágyi, Balázs Brém, Gábor Bárti, László Tölgyesi, Miklós Hollósi, Elemér Vass „Dirhodium complexes: determination of absolute configuration by the exciton chirality method using VCD spectroscopy” *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 13137-13144.

2.3.3. *N*-arilezett/alkilezett aminosavak, mint királis ligandumok Rh(II)₂-komplexekben

Az előzőekben tárgyalt, nem védett aminosavakat tartalmazó Rh(II)₂-komplexek érdekessége, hogy a ligandumok koordinációja királis elrendeződéshez vezet, továbbá azokban az esetekben, ahol szekunder aminocsoport van jelen (prolin, pipekolinsav), a fémhez kötött nitrogén szintén sztereogén centrummá válik. A királissá vált nitrogén sztereokémiájának behatóbb vizsgálata érdekében előállítottuk néhány aminosav (Phe, Val, Pgl, stb.) *N*-fenilezett és -izopropilezett származékát és azok ródiumpkomplexeit. Kiroptikai spektroszkópiai módszerekkel, valamint DFT számításokkal a koordinálódott N-atom konfigurációja könnyen meghatározható, főként az ECD-spektrumok elemzése révén. Többdimenziós NMR vizsgálatok is alátámasztották a koordinálódó N-atom koordinációs stabilitását és konfigurációját. A fentiek alapján elmondható, hogy a ligandum kiralitása (*S*/*R*) egyértelműen meghatározza a kialakuló komplex konfigurációját (Λ/Δ) illetve a koordinálódott N-atomét (*S*/*R*).¹⁸

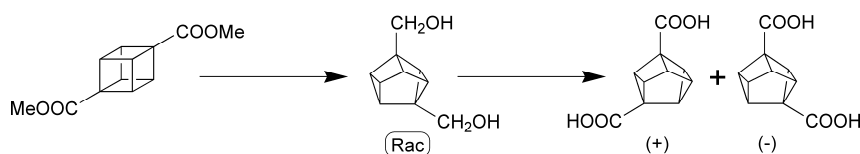
2.4. Egyéb alkalmazási területek

2.4.1. Királis molekulák abszolút konfigurációjának meghatározása VCD-spektroszkópiával

A VCD egyik fő alkalmazási területe a királis molekulák abszolút konfigurációjának meghatározása a mért és kvantumkémiai módszerekkel (DFT szinten) számított spektrumok összehasonlítása alapján.

A kolozsvári Babes-Bolyai és a budapesti Semmelweis Egyetemen együttműködés keretében vizsgáltuk a 3-klór-1-(4-fluorfenil)propan-1-ol, 3-klór-1-(4-jódifenil)propan-1-ol, valamint a 3-klór-1-fenilpropan-1-ol lipáz-katalizált enantioszelektív enzimatis reakciókkal előállított enantiomerjeinek abszolút konfigurációját. Az együttműködő partnerek a szintézis során racém alkoholokon *Pseudomonas fluorescens*-ből származó lipázzal (LAK) enantioszelektív acetilezést hajtottak végre, majd az így nyert 1-aryl-3-klórpropil-észterekből *Candida rugosa* eredetű lipáz (CRL) jelenlétében enantioszelektív hidrolízis segítségével jutottak az enantiomertiszta alkoholokhoz. A mért és számított VCD-spektrumok összehasonlításával megállapítottuk, hogy az aromás gyűrűn levő szubsztituenstől függetlenül a jobbra forgató enantiomer abszolút konfigurációja *R*, a balra forgatóé pedig *S*.¹⁹

Nemrég, tanszéken belüli együttműködés keretében a 1,3-kuneándikarbonsav-dimetilészter enantiomerek abszolút konfigurációját is meghatároztuk VCD-spektroszkópia segítségével. A vizsgált vegyület előállítása 1,4-*bisz*(acetoxmetil)-kubánból Ag(I)-sókkal kiváltott átrendeződéssel 1,3-*bisz*(hidroximetil)-kuneánon keresztül történt, melyet K₂MnO₇-os oxidációval racém 1,3-kuneándikarbonsavvá lehet alakítani (**11. ábra**). Brucinnal végrehajtott parciális resolválással a (+)-1,3-kuneándikarbonsav átkristályosítás után 86% enantiomerfelesleget mutató terméként izolálható (az anyalúgból hasonló tisztaságú (-)-1,3-kuneándikarbonsav is kinyerhető).



11. ábra

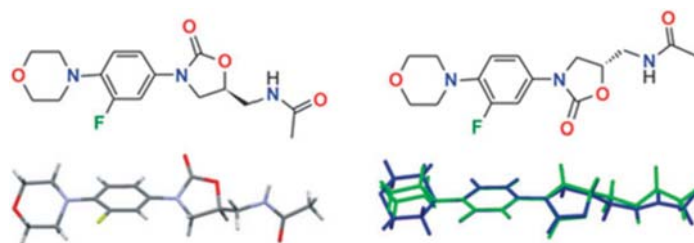
¹⁸ Gábor Szilvágyi, Márk Szabó, Márk Kleineisel, Elemér Vass, Antal Csámpai, Miklós Hollósi „AC determination of twisted rhodium complexes: can the coordinated amino group be chiral?” 26th International Symposium on Chiral Discrimination, ISCD-26, 2013, Prága, Csehország - *poszter*

¹⁹ Laura Ancuța Pop, Andrea Czompa, Csaba Paizs, Monica Ioana Toșa, Elemér Vass, Péter Mátyus, Florin-Dan Irímie „Lipase-Catalyzed Synthesis of Both Enantiomers of 3-Chloro-1-arylpropan-1-ols” Synthesis 2011, **18**, 2921-2928.

A balra forgató termék diazometánnal történő O-metilezésével előállított (-)-1,3-kuneándikarbonsav-dimetilészter DMSO-d₆-ban végzett VCD-spektroszkópai vizsgálata és a kvantumkémiai számítások alapján arra következtettünk, hogy a molekula 4 konformer majdnem egyenlő arányú elegyként van jelen az oldatban, és (-)-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*,7*S*,8*R*)-kuneán-1,3-dikarbonsav dimetilésztereként azonosítható. Az eredményekről egy publikáció van előkészületben.²⁰

2.4.2. Gyógyszerhatóanyagok polimorf formáinak megkülönböztetése szilárdfázisú ECD- és VCD-spektroszkópiával

A polimorfok ugyanazon molekula különböző térbeli elrendeződéseiből vagy konformereiből létrejövő szuperstruktúrák, amelyek eltérő fizikai tulajdonságokkal (pl. oldhatóság, higroszkóposság, stabilitás, stb.) rendelkeznek, emiatt a gyógyszeriparban alkalmazott hatóanyagok esetében jellemzésük és azonosításuk különös jelentőséggel bír. A Lengyel Tudományos Akadémia Szerves Kémiai Intézetével együttműködve szilárdfázisú kiroptikai spektroszkópai módszerekkel (ECD és VCD) vizsgáltuk a linezolid gyógyszerhatóanyag II és III polimorfjainak szerkezetét (12. ábra).²¹



12. ábra. A linezolid II (bal) és III (jobb) polimorf formájának szerkezete

A II forma ECD-spektrumában 221 nm-nél jelentkezik egy diagnosztikai sáv, mely hiányzik a III forma spektrumából. A mért szilárdfázisú ECD-spektrumok jól egyeznek a röntgenkristallográfiai adatok alapján a két polimorf szerkezetre számított ECD-görbékkel. A két polimorf forma VCD-spektruma erősen eltérő, elsősorban a karbonil vegyértékrezgési tartományban, ahol két erős, ellentétes előjelű diagnosztikai értékű sáv észlelhető. Az eredmények egyértelműen igazolják a szilárd fázisú ECD és VCD alkalmasságát királis molekulák polimorf szerkezeteinek megkülönböztetésére.

2.4.3. Erős és gyenge hidrogénkötések VCD-spektrumra gyakorolt hatásának vizsgálata 2-klórpropionsav esetében

Az ELTE TTK Kémiai Intézet Molekulaspektroszkópai Laboratóriumával (Dr. Tarczay György és munkatársai) együttműködve vizsgáltuk az *S*-(-) és *R*-(+)-2-klórpropionsav VCD-spektrumát CCl₄ és CHCl₃ oldatban, valamint alacsony hőmérsékletű szilárd Ar-mátrixban (mátrixizolációs körülmények között).²² A monomer állapotú molekulák mellett erős H-kötéssel stabilizált dimerek, valamint gyenge H-kötéses 2-klórpropionsav – CHCl₃ komplexek tanulmányozására is sor került mind kísérleti (oldatban és szilárd Ar-mátrixban), mind pedig elméleti szinten, kvantumkémiai számítások segítségével.

Kimutattuk, hogy a H-kötéses dimerképződés drasztikusan megváltoztatja, de még a kloroformmal kialakított gyenge H-kötéses komplexképződés is jelentősen befolyásolja a VCD-

²⁰ Zoltán Szőnyegi, István Jalsovszky, Gábor Szilvágyi, „Synthesis and absolute configuration of 1,3-disubstituted cuneane derivatives”, *előkészületben*.

²¹ Jadwiga Frelek, Marcin Góreczki, Marta Łaszcz, Agata Suszczyńska, Elemér Vass, Wojciech J. Szczepek „Distinguishing between polymorphic forms of linezolid by solid-phase electronic and vibrational circular dichroism” *Chem. Commun.* 2012, **48**, 5295-5297.

²² Sándor Góbi, Elemér Vass, Gábor Magyarfalvi, György Tarczay „Effects of strong and weak hydrogen bond formation on VCD spectra: a case study of 2-chloropropionic acid”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011, **13**, 13972-13984.

spektrum alakját. Az eredmények alapján a karbonsavak abszolút konfigurációjának VCD-spektroszkópiai meghatározására általános következtetések vonhatók le. A méréseket célszerű a dimerképződés elősegítése érdekében viszonylag tömény oldatban (0.1 mol dm^{-3}) végezni, a dimerek elméleti és számított spektruma ugyanis jobb egyezést mutat. Mivel kloroformban a monomerek stabilizálása és/vagy gyenge H-kötéses komplexek kialakulása miatt a spektrum bonyolultabb és kevésbé intenzív, mint CCl_4 -ban, célszerű az utóbbit választani oldószerként, amennyiben a vegyület oldhatósága ezt lehetővé teszi.

3. Következtetések és kitekintés

Projektünk keretében számos diamid modellvegyület, peptid, peptidmimetikum, védett vagy nem védett aminosavat tartalmazó királis Rh(II)_2 -komplex és más típusú királis szerves vegyület térszerkezetének felderítését végeztük el kiroptikai spektroszkópiai módszerek (ECD, VCD és egyes esetekben ROA) segítségével. A projekt Knapp Krisztina és Szilvágyi Gábor Ph.D. hallgatók doktori munkájához szorosan kapcsolódik (diamid modellvegyületek ill. Rh_2 -komplexek témakörében), valamint Szabó Márk BSc hallgató diplomamunkáját tette lehetővé (Rh_2 -komplexek területén).

A projekt egyik kiemelkedő eredményének tekintjük a kelátosan koordinált aminosavakat tartalmazó, axiális kiralitással rendelkező Rh(II)_2 -komplexek abszolút konfigurációjának egyszerű és gyors megállapítását lehetővé tevő VCD excitonkiralitási szabály kidolgozását.

A sokrétű vizsgálatok lehetővé tették néhány, a módszerek alkalmazhatóságának határát érintő kérdés megválaszolását. Az egyik probléma a VCD-sávok számított előjelének egyes esetekben tapasztalt bizonytalansága, az úgynevezett nem robusztus rezgési módusok léte, ezek rontják a módszer alkalmazhatóságát és kellő óvatosságra intenek a spektrumok értelmezésében.

Eredményeink arra utalnak, hogy a szilárd fázisú kiroptikai technikák közül a szilárd fázisú ECD viszonylag jól alkalmazható molekuláris szintű információ kinyerésére, ezzel szemben a szilárd fázisú VCD a kristályban kialakuló szupramolekuláris rendszerre jellemző, ahol az intermolekuláris kölcsönhatások torzító hatása megnehezíti a spektrumok értelmezését. Bizonyítottuk viszont, hogy a szilárd VCD alkalmas polimorf kristályszerkezetek megkülönböztetésére.

Problémát okozhat az oldószer orientált koordinációja, amely megváltoztathatja egyes VCD- vagy ROA-sávok előjelét, de befolyásolhatja a konformereloszlást is, ami az explicit oldószermodellek alkalmazásának szükségességét vetíti előre.