

— Tudományos Diákköri Dolgozat —

UHLÁR ZSÓFIA

Átvihető-e a szerin komplexképző tulajdonsága peptidekre?

Témavezetők: Dr. Schlosser Gitta
Szerves Kémiai Tanszék
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport
Dr. Magyar Anna
Szerves Kémiai Tanszék
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport



— Eötvös Loránd Tudományegyetem —
— Természettudományi Kar —
— Budapest, 2014 —

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Hudecz Ferenc akadémikusnak az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport vezetőjének, hogy munkámat az ELTE Szerves Kémiai Tanszéken, illetve az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban lehetővé tette.

Témavezetőim, Dr. Schlosser Gitta tudományos munkatárs és Dr. Magyar Anna tudományos főmunkatárs, rendkívül nagy segítséget nyújtottak az új kémiai ismeretek megszerzésében és a munkám koordinálásában. Hálásan köszönöm türelmüket és segítségüket.

Továbbá köszönet illeti a 403-as labor minden tagját, valamint a családomat a támogatásért és tanácsokért amelyekkel elláttak.

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék.....	
1. Bevezetés.....	
2. Irodalmi áttekintés.....	
2.1. A tömegspektrometria alapjai.....	
2.2. Az elektro spray ionizáció.....	
2.3. Nemkovalens komplexek vizsgálata tömegspektrometriával.....	
2.4. A szerin komplexképzése: mágikus oktamer.....	
2.4.1. A királis diszkrimináció jelensége.....	
2.4.2. A szerin oktamer szerkezete.....	
2.5. Peptidszintézis.....	
3. Célkitűzés.....	
4. Kísérleti rész.....	
4.1. Stratégiák a folyadékfázisú peptidszintézishez:.....	
4.1.1. H-L-Ser-L-Ser-OH dipeptid szintézise aktívészteres kapcsolással.....	
4.1.2. L-Ser-L-Ser dipeptid szintézise in situ aktívészteres kapcsolással.....	
4.1.3. H-L-Ser-L-Ser-OH x TFA dipeptid szintézise vegyesanhidrides kapcsolással.....	
4.1.4. H-L-Ser-D-Ser-OH x TFA dipeptid szintézise vegyesanhidrides kapcsolással.....	
4.2. Vékonyrétegekromatográfiás reakciókövetés tömegspektrometriás detektálással.....	
4.3. Tömegspektrometriás mérések.....	
5. Eredmények.....	
5.1. Peptidszintézis.....	
5.2. A szerin komplexképzésének tömegspektrometriás vizsgálata.....	
5.3. A dipeptidek komplexképzésének tömegspektrometriás vizsgálata.....	
5.5. Távlati tervek.....	
6. Összefoglalás.....	
Irodalomjegyzék.....	

Rövidítésjegyzék

ACS	átlagos klaszterméret (average cluster size)
Boc	terc-butiloxikarbonil csoport
BOP	benztriazol-1-il-oxi-trisz(dimetil-amino)-foszfónium-hexafluoro-foszfát
CD	cirkuláris dikroizmus spektroszkópia
CID	ütközéses aktiváció (collision induced dissociation)
DCC	diciklohexil-karbodiimid
DCU	diciklohexil urea
DMF	dimetil-formamid
EI	elektronütközéses ionizáció (electron impact ionization)
ESI	elektrospray ionizáció (electrospray ionisation)
EtOAc	etilacetát
FAB	gyorsatom bombázás (fast atom bombardment)
HOBt	1-hidroxi-benztriazol
MALDI	mátrixsal segített lézerdeszorpció/ionizáció (matrix assisted laser desorption/ionization)
MN	mágikus szám (magic number)
MS	tömegspektrometria (mass spectrometry)
NMM	N-metil morfolin
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
IR	infravörös spektroszkópia
iBCC	klórhangyasav-izobutilészter
TFA	trifluorecetsav
UV	ultraibolya
VRK	vékonyréteg kromatográfia

1. Bevezetés

A 20 fehérjealkotó aminosav egyike a szerin. 1902-ben állapították meg a szerkezetét, a szerkezetbizonyító szintézis Hermann Emil Fischer Nobel-díjas német szerves kémikus nevéhez köthető. A szerin sajátos komplexképző viselkedését tömegspektrometria alkalmazásával 2001-ben fedezték fel, amely azóta is a kutatások középpontjában áll.¹ Többféle komplexe közül a nyolc molekulából álló, oktamer szerkezetű komplex kiemelkedő arányban van jelen a tömegspektrumban. Az oktamer komplex különleges tulajdonsága, – szokatlan stabilitása mellett – hogy kialakulása csak optikailag tiszta, L, vagy D konfigurációjú aminosavat tartalmazó oldatból kedvezményezett.¹⁻⁶

Munkám célja annak felderítése volt, hogy a szerin sajátos komplexképzése hogyan nyilvánul meg szerin-szerin dipeptidek esetében. A szerin tömegspektrometriával detektálható komplexképzésével számos tudományos munka foglalkozott az elmúlt évek során. A belőle képzett dipeptid tulajdonságainak vizsgálata azonban még új terület. Amerikai tudósok szerint szoros összefüggés lehet a földi élet kialakulása és a szerin aminosav szokatlan komplexképzése között, és részletesen tanulmányozták más, a biopolimerek alapvető építőköveinek tekinthető vegyületek részvételét a komplexek kialakulásában. Munkám során ennek az elméletnek és napjainkban is élénken zajló tudományos kutatásnak egy új területébe kapcsolódtam be. Kutatómunkám során azt vizsgáltam, hogy a szerin aminosav komplexképzése hogyan nyilvánul meg a belőle felépített dipeptidek esetében, megjelenik-e hasonló szokatlan jelenség kis molekulatömegű peptidek szintjén is.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A tömegspektrometria alapjai

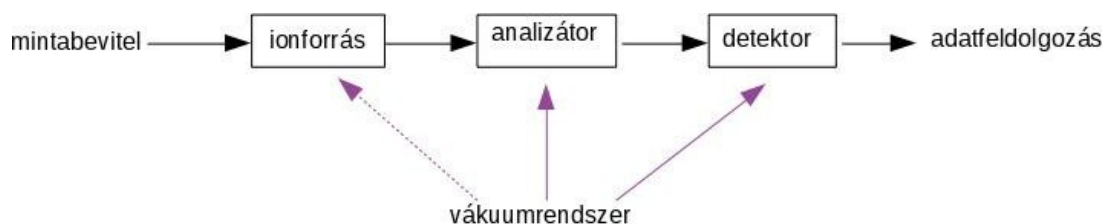
A tömegspektrometria napjaink egyik leghatékonyabb analitikai módszere. Létrejöttét Joseph John Thomson, Nobel-díjas angol tudós kísérletei alapozták meg a XX. század elején. Thomson felfedezte és kísérletileg igazolta az izotópok létezését oly módon, hogy gázokból ionokat állított elő, az ionokat mágneses és elektromos mező segítségével eltérítette, végül fényérzékeny lemezen detektálta. Az izotópok tömegének és gyakoriságának meghatározására használt technikát ma a tömegspektrometria alapjának tekintjük. Thomson 1913-ban publikálta a könyvét a módszeréről, mely így napjainkban épp 100 évesnek tekinthető.⁷ Kezdetben csupán szervesetlen kémiai kutatások során, az elemek és izotópjainak vizsgálatára használták a technikát. A szerves kémiában az 1950-es évektől kezdtek alkalmazni, és a technika fejlődésével egyre több komponensű minta és összetettebb vegyület vizsgálata is lehetővé vált. A tömegspektrometria egyre elterjedtebb alkalmazása óriási lendületet adott a szerves kémiai tudományos kutatásoknak és mára a szerves kémia és a biokémia nélkülözhetetlen analitikai módszerévé vált.

Egy tipikus tömegspektrometriás mérés időtartama rövid, csupán néhány perc, és igen kis mennyiségű, akár nanogramm tömegű anyag vizsgálata és meghatározása is elvégezhető.

A tömegspektrométer használata során töltéssel rendelkező részecskéket állítunk elő és töltéssűrűségekre eső tömegük (tömeg/töltés, m/z) alapján választjuk el őket egymástól. Ehhez minden esetben csökkentett nyomást használunk és mágneses vagy elektromos teret az ionok tömeg/töltés szerinti elválasztásához. A tömegspektrumhoz úgy jutunk, hogy folyamatosan mérjük a különböző ionok intenzitását, ezek adják a spektrumon a csúcsokat. A vízszintes tengelyen a tömegértékek olvashatóak le.

A tömegspektrométereket általában felépítő legfontosabb részek:

- mintabeviteli rendszer
- ionforrás
- analizátor
- detektor
- vákuumrendszer
- számítógép és az adatok kiértékelésére szolgáló program



1. ábra: A tömegspektrométer fő részei

Mindegyik részhez külön-külön feladat köthető. Az ionforrásba a mintát bejuttathatjuk közvetlenül, vagy kromatográfias rendszeren keresztül. Az ionforrás gázfázisú ionokat hoz létre a vizsgálandó anyagból. A keletkezett ionokat minél rövidebb idő alatt, lehetőleg egy jól fókuszált nyálkában kell eljuttatni az analizátorba. Az ionok mozgását feszültségkülönbség biztosítja, ami általában néhány kilovolt. Az ionok hatékony fókuszálásához, az ütközések számának csökkentéséhez nagyvákuumra van szükség, amely általában legalább kétfokozatú: az első fokozatot rotációs vákuumpumpák segítségével, míg a nagyvákuumot (végvákuumot) turbomolekuláris pumpákkal biztosítják.

Az első, és ma is az egyik legelterjedtebb ionizációs módszer az elektronütközéses ionizáció (EI) volt. A spektrumadatbázisokban lévő tömegspektrumok 95%-a ilyen módszerrel készült. Az elektronütközéses ionizáció során a vizsgálni kívánt szerves vegyületet vákuumban elpárologtatják, és nagyenergiájú elektronokkal ionizálják. A létrejövő gyök jellegű kation (molekulaion) gyorsan kisebb tömegű, az adott vegyületre igen jellemző fragmensekre bomlik. A módszer hátránya, hogy csak olyan szerves anyagokat vizsgálhatunk, amelyek a termikusan történő elpárologtatás során nem bomlanak el.

A FAB, azaz a gyorsatom bombázásos ionizációs módszer napjainkban már nem használatos, azonban tudománytörténeti szempontból fontos technika. Ebben az esetben a mintát alacsony tenziójú, viszkózus folyadékban oldják fel, és az ionforrásban az oldat egy

kis cseppjét nagy energiájú atomsugárral sugározzák be. A besugárzás hatására gázfázisú, protonált ionok (kvázimolekulaionok) jönnek létre.

A MALDI (mátrixszal segített lézerdeszorpciós ionizáció) egy mátrixvegyület, mint energiaközvetítő alkalmazásával végzett lézerdeszorpciós ionizáció. Lágymű ionizációs módszer, amely lehetővé teszi a termikusan különösen érzékeny és akár nagyon nagy molekulatömegű anyagok, biopolimerek vizsgálatát. A MALDI ionizáció során a gerjesztő energiát egy jól szabályozható lézerforrásból kapjuk. Az ionizáció előtt a vizsgálandó vegyületet egy olyan szerves vegyülettel kristályosítják össze, amelynek a lézer hullámhosszán nagy az UV-elnyelése. A lézerbesugárzás hatására elsőként a mátrixmolekulák gerjesztése történik meg, amelyek aztán képesek gázfázisba vinni és ionizálni a vizsgálandó mintát is.

Ma az egyik legelterjedtebb ionizációs módszer az ESI, azaz elektropray ionizáció, amelynek során a minta vizes oldatát porlasztják elektromos térben. Ezt a technikát alkalmaztam kísérleteim során, így a későbbiekben részletesen tárgyalom.

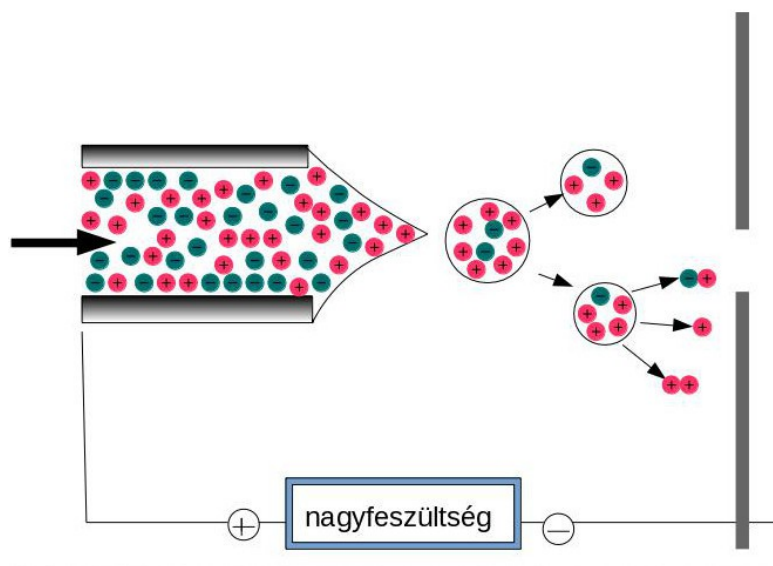
Az analízátor fajlagos tömeg (m/z) alapján szétválasztja az érkező ionokat. Az ionok elválasztására sokféle módszer ismert, ez alapján többféle analízátort is megkülönböztetünk, mint például: mágneses, repülési idő, kvadrupól, ioncsapda, stb.

Elektronütközéses ionizáció (kemény ionizációs módszer) alkalmazásával, a molekulaiionok képződése mellett fragmensek, töredékionok is keletkeznek. Ezek alapján tudunk következtetni a molekula szerkezetére. Azonban ha lágymű ionizációs módszerrel, például elektropray ionizációval dolgozunk, általában nem keletkeznek fragmensionok. Ekkor, ha szerkezeti információra van szükségünk, valamilyen technikával külön lépésben kell fragmentálnunk az ionokat. Utóbbi módszert nevezzük tandem tömegspektrometriának. Az egyértelműség érdekében külön névvel illetjük a fragmentálni kívánt iont (anyaion vagy prekursorion) és a fragmenseket (leányion). A fragmensionok létrehozására legelterjedtebben használt módszer a CID (collision induced dissociation), más néven ütközéses aktiváció. A módszer lényege, hogy a vizsgálni kívánt ionokat inert gázzal (Ar, N₂ stb.) ütköztetjük, ekkor belső energiává alakul a molekulák kinetikus energiája és bekövetkezik a fragmentáció.

2.2. Az elektropray ionizáció

Az elektropray ionizáció napjainkban az egyik legelterjedtebben alkalmazott ionizációs módszer. Elsőként Dole és munkatársai hoztak létre vákuumban ionnyalábot⁸, és bár a technika még nem volt elég fejlett hozzá, elméletben felvetették a lehetőségét, hogy az elektropray ionforrást tömegspektrométerhez kapcsolják. Utóbbit végül John B. Fenn, amerikai professzor valósította meg, aki 2002-ben kémiai Nobel díjat nyert ezzel kapcsolatos munkásságáért. Fenn professzor úttörő munkát végzett a elektropray ionizáció mechanizmusának feltérképezésében.⁹⁻¹⁰

Az elektropray ionforrás egy fém kapillárisból és egy ettől néhány cm távolságra lévő sík alakú elektródból áll (2.ábra).



2. ábra: Az elektropray ionizáció működése

Az eljárás során a rendelkezésre álló mintából alacsony koncentrációjú vizes oldatot készítünk, amelyet a kapillárison végigvezetve légköri nyomáson porlasztunk. A kapillárisra nagyfeszültség (2-5 kV) van kapcsolva, amely a porlasztógázzal együtt végzi a vizes oldat hatékony porlasztását. Ennek során nagyon apró, töltéssel rendelkező cseppek képződnek. Kellően nagy feszültség esetén a tű hegyén úgynevezett Taylor kúp, azaz kúp alakú folyadékréteg alakul ki. A meniszkusz felületén feldúsulnak a pozitív ionok és így a taszítás köztük egyre nő, az ellenelektrod vonzó hatása pedig egyre jobban érvényesül. A kialakuló Taylor kúpból így vékony sugárban pozitív töltéssel rendelkező részecskék, cseppek lépnek ki és az ellenelektrod felé haladnak. Mozgás közben az illékony oldószer elpárolog a cseppekből, a töltés azonban változatlan marad, így az egységnyi területre jutó töltéssűrűség

egyre nő. Fűtéssel és/vagy gázárammal felgyorsíthatjuk az oldószer elpárolgását. Az azonos töltésű ionok taszítják egymást, így amikor a töltések között fellépő taszítás nagysága eléri a folyadék felületi feszültségét, úgynevezett Coulomb hasadás vagy más néven Coulomb robbanás következik be: a nagyobb méretű töltött cseppek sok-sok kisebb cseppre esnek szét. Ezek a kisméretű cseppek is töltéssel rendelkeznek, amelyekből az oldószer párolgása tovább folytatódik. A folyamat végén gázfázisú ionok képződnek. Az ionizáció pontos mechanizmusa - a módszer népszerűségének ellenére - még ma sincs teljesen felderítve.

Az elektropray ionizációt széleskörűen alkalmazzák poláris, ionos vegyületek vizsgálatára; peptidek, fehérjék esetén ez az első számú ionizációs technika.

Az elektropray ionizáció során a vegyületek leggyakrabban protonált formában jelentkeznek a spektrumban, amelyek többszörösen töltöttek is lehetnek. Tipikus jelölésük: $[M+H]^+$, illetve $[M+nH]^{n+}$. A többszörös töltést hordozó ionok, ionsorozatok igen jellemzőek az ESI-re. A vegyületek ritkábban adduktionok, elsősorban nátriumionnal vagy káliumionnal képzett adduktok formájában jelentkeznek a tömegspektrumokban: $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$. Az ionizáció során illékony oldószereket és puffereket kell használnunk, ellenkező esetben az érzékenység jelentősen csökkenne és a tömegspektrométer elszennyeződne.

2.3. Nemkovalens komplexek vizsgálata tömegspektrometriával

A molekulák közötti, illetve molekulán belüli nemkovalens kölcsönhatások erőssége 1-2 nagyságrenddel kisebb a kovalens kötésekénél, szerepük mégis óriási, hiszen a kapcsolódási lehetőségek igen változatosak. Meghatározó szerepük van a biopolimerek, fehérjék, peptidek és a DNS szerkezetének, tulajdonságainak alakulásában.

A nemkovalens, másodlagos kölcsönhatásoknak számos formája ismert, például:

- Hidrogénkötés (hidrogénhidas kölcsönhatás), amelyben egy hidrogén-donor és egy hidrogén-akceptor atom vagy atomcsoport vesz részt.
- Ionos kölcsönhatás töltéssel rendelkező atomok vagy atomcsoportok között.
- Dipól-dipól kölcsönhatás nem ionos, de dipólusmomentummal rendelkező molekulák illetve atomcsoportok között.
- Konjugált π -rendszerrel rendelkező molekulák vagy csoportok közötti kölcsönhatás.

A tömegspektrometriára épülő technikákról kevésbé közismert, hogy alkalmasak lennének nemkovalens komplexek vizsgálatára, pedig a molekuláris kölcsönhatások kutatása a tömegspektrometria egyik kulcsfontosságú területe. Ennek legfőbb oka, hogy más szerkezetkutatási módszerekkel (NMR, IR, CD) ellentétben, egy tömegspektrometriás mérés során a vizsgálni kívánt komplex egyedileg izolálható és vizsgálható a gázfázisban. Tömegspektrometriás mérések alapján meghatározhatjuk például a komplex molekulatömegét, sztöchiometriáját, részletesebb szerkezetét is.

Nemkovalens komplexek vizsgálata során kulcsfontosságú lépés a minta ionizációja, mivel az ionizáció hatására a gyenge másodlagos kölcsönhatással összetartott asszociátumok széteshetnek. Komplexek gázfázisba juttatása és ionizációja leginkább a légköri nyomáson működő, porlasztós (spray) ionizációs technikák, elsősorban az ESI alkalmazásával lehetséges.¹¹ Kísérleteim során is ezt a technikát alkalmaztam.

Egy, a szokványos analitikai mérésekhez beállított tömegspektrométerrel azonban nem észlelünk a spektrumban jelentős mennyiségben nemkovalens komplexeket, asszociátumokat. Másodlagos kölcsönhatások vizsgálata csak a mérési paraméterek finomhangolása után lehetséges.

2.4. A szerin komplexképzése: mágikus oktamer

John B. Fenn és munkatársai kutatásaik során megfigyelték, hogy az elektropray ionizációval asszociátumok is detektálhatóak. Részletesen tanulmányozták a klaszterképzés jelenségét és több aminosav esetében is hasonló jelenséget észleltek.¹² 2001-ben az amerikai Purdue egyetem professzora, Graham Cooks és munkatársai elsőként figyeltek fel a szerin aminosav sajátos, tömegspektrometriával detektálható komplexképzésére: a spektrumokban szokatlanul kiemelkedő, nyolc molekula asszociációjával képződő oktamer komplexet detektáltak.¹ Az ilyen különleges stabilitással rendelkező klaszterionokat az irodalomban „mágikus” klasztereknek, mágikus számmal rendelkező klasztereknek nevezik. Megfigyeléseik alapján megfogalmazták azt is, hogy a klaszterképződés során a páros tagszámú klaszterek nagyobb stabilitást mutatnak a páratlan tagszámúakhoz képest.¹⁻² A kiemelkedő intenzitással detektálható ionokat jellemezhetjük az úgynevezett mágikus számmal (magic number, MN) amely a szomszédos ionok intenzitásértékéből számítható:

$$MN_n = \frac{2 \times I_n}{I_{n-1} + I_{n+1}}$$

ahol n az adott klaszteriont felépítő molekulák száma (tagszám) és I a tömegspektrumban mért intenzitás.

Az oktamer mellett más tagszámú komplexek képződése is látható volt a tömegspektrumon, azonban ezek jóval kisebb intenzitásúak. A protonált monomer és a dimer mellett csupán a protonált oktamer klaszter volt észlelhető kiemelkedő intenzitással. Tandem tömegspektrometriás vizsgálatokat is végeztek, amelyek során megfigyelhető volt, hogy az egyszerűen protonált oktamer könnyen elveszít egy dimer egységet. A jelenséget a hexamer klaszter esetében is tapasztalták. Ebből arra következtettek, hogy az oktamer komplex dimer egységekből épül fel.

Tandem tömegspektrometriás és ion mobilitási mérések pedig arra utaltak, hogy az oktamer klaszter 841 m/z értéknél detektálható csúcsa valójában több csúcs átfedése, többszörösen töltött, nagyobb tagszámú oligomerek esnek ugyanahhoz a tömeg/töltés értékhez: $[\text{Ser}_{8n} + n\text{H}]^{n+}$, $n=1, 2, 3, 4$, stb..

2.4.1. A királis diszkrimináció jelensége

A szerin oktamer talán legérdekesebb tulajdonsága, hogy kialakulása csupán optikailag tiszta, L vagy D konfigurációjú aminosavat tartalmazó oldatból kedvezményezett. Ellentétes kiralitású szerin aminosav hozzáadása az oldathoz fokozatosan rontotta a komplex intenzitásértékét. Cooks professzor kutatócsoportja által publikált adatok szerint az optikailag tiszta oldat esetén számítható mágikus szám érték 50, míg a racém elegyben csupán 3.¹² Ezt a komplexképzés során megfigyelhető királis diszkriminációt korábban egyetlen más esetben sem tapasztalták.

A kutatók figyelmét felkeltette ez a különleges tulajdonsággal bíró komplex és a további vizsgálatok is számos meglepő eredményekkel szolgáltak. Takáts Zoltán és munkatársai kísérleteik során azt tapasztalták, hogy az oktamerben néhány aminosavat kiroszelektív módon ki lehet cserélni egyéb vegyületekre. Így például az L-szerinből álló komplex egyes aminosavjai helyettesíthetők D-glükózzal vagy más L-aminosavakkal.¹³⁻¹⁴

Ezen kívül beépíthető még a komplexbe foszforsav és számos átmenetifémion (réz(II), vas(II), vas(III)) is.¹⁴

A szerin és a glicerinaldehid molekulák kondenzációs reakciójában Schiff-bázis keletkezik, amely szintén képes a szerin oktamerben egy vagy két szerinmolekula helyettesítésére. Takáts és munkatársai tapasztalatai alapján a szerinmolekulák cseréje királisan szelektív módon történik, azaz csak a D-glicerinaldehid reagált a komplexben az L-szerinnel. A treonin volt az egyetlen másik vegyület, amelynél a szerinhez hasonló jelenséget tapasztaltak.¹⁴

Az eddigi kísérletekben tapasztalt kiralitásfüggő aminosav-helyettesítések, királis szelekciók megfelelnek a természetben is tapasztalható biomolekuláris kiralitásnak. A témával foglalkozó kutatók a királis információk átadásának lehetőségével, a szerin sajátos komplexképző viselkedésével magyarázzák a Földön tapasztalható homokiralitást, és ezáltal az élet megjelenésének lehetőségét.^{1-2,13-14}

2.4.2. A szerin oktamer szerkezete

A szerin különleges tulajdonságai az oktamer szokatlanul stabil szerkezetére engednek következtetni, azonban, bár az irodalomban sokan vizsgálták és több elméletet is felállítottak, hivatalosan elfogadott szerkezet még ma sem létezik.

Az oldatfázisban kialakuló ikerionos szerkezet jól ismert, azonban gázfázisban nem számolhatunk ilyen hatással. Az oldószer töltésszabilizáló hatása megszűnik gázfázisban, ezért feltételezzük, hogy nagyvákuumban az aminosavak monomerjei semleges szerkezettel rendelkeznek. Az úgynevezett önszolvatációhoz elméleti számítások alapján azonban elég csupán néhány aminosav. Az önszolvatáció a karboxil- és aminocsoportok között történik és gázfázisban is lehetővé teszi az ikerionos szerkezet létrejöttét.

Az irodalomban olvasható elképzelések is e két fő típus köré csoportosíthatóak. Vagy az ikerionos szerkezet, vagy a semleges szerkezetű monomerekből álló képződmény jelenik meg az egyes kutatócsoportok publikációiban.^{3,6}

Cooks és munkatársai elsőként egy körszerű szerkezetet vázoltak fel, amelyben a nyolc szerin molekula fej-farok elrendeződésben kapcsolódott egymáshoz. Ebben az elképzelésben az aminosavak semlegesek. Nem sokkal később azonban kidolgoztak egy újabb, sokkal valószínűbb szerkezetet, amelyben négy dimer egység építi fel a dobszerű

képződményt.¹ A semleges szerinmolekulákat itt karboxil-karboxil hidrogénkötés tartja össze és a dimer egységek közötti kapcsolódást hidroxil-amin hidrogénhidak teszik lehetővé.

Countermand és Clemmer ikerionos szerinmolekulából felépülő, kompakt szerkezetet javasoltak. Modelljüket a kísérleti úton nyert ütközési keresztmetszet adatok alapján készítették el. Bár a kísérletek jó egyezést mutatnak a számolt értékekkel, a szerinmolekulák hidroxil csoportja nem vesz részt a hidrogénkötésekben, így nehezen értelmezhető a klaszter homokirális hajlama.

A Beauchamp és munkatársai által javasolt szerkezet is zárt, benne ikerionos szerinmolekulák helyezkednek el egy „lapított kocka” csúcsain. Az alsó és felső egységeket hidrogénhidak tartják össze, így négyponthoz kapcsolódik a szerin. Az asszociátum homokirális hajlamát az oldalláncok közötti hidrogénkötések rendszere magyarázza.³

Schalley és Weis következtetései alapján a szerin mindhárom funkciós csoportja érintett az asszociátum képzésében. A lényeges különbség Schalley és Beauchamp modellje között, hogy az alegységek között négy helyett nyolc pontos kapcsolat jön létre, továbbá a hidroxilát-hidroxil funkciós csoportok között hidrogénkötés áll fenn, amely magyarázhatja a homokirális törekvést.⁶

Takáts és munkatársai gázfázisú hidrogén/deutérium csere reakciót hajtottak végre a szerin oktameren, és meglepő módon két eltérő szerkezetet is azonosítottak, amelyek eltérő hidrogén/deutérium csere sebességgel rendelkeztek.¹⁵ Az egyik oktamer komplex, amely valószínűleg az oldatfázisbeli szerkezettel rendelkezett és lassabb H/D cserére volt képes, erősen függött a kiindulási szerinoldat királis összetételétől. A másik oktamer komplexet az elektropray ionizáció valamelyik részfolyamatából származó vagy az eredeti szerkezetből átrendeződött komplexhez kötötték.

2.5. Peptidszintézis

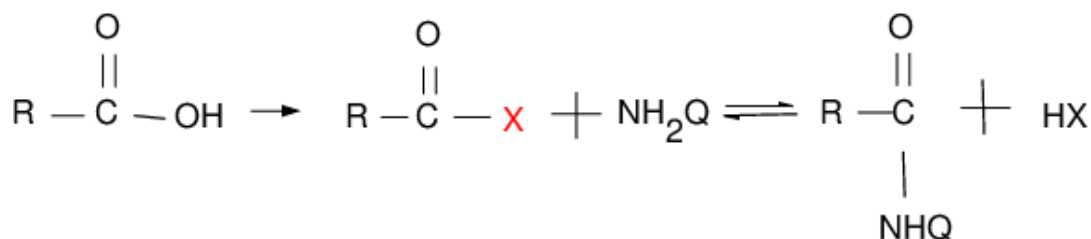
A peptidek szintézisére sok különböző módszer alkalmazható. Napjainkban a két elterjedten alkalmazott módszer a klasszikus folyadékfázisú, valamint a szilárdfázisú peptidszintézis.

Ha kis tagszámú peptideket szeretnénk előállítani, akkor általában lépésenkénti szintézist alkalmazunk. Minden hosszabbítási ciklusban tulajdonképpen két művelet ismétlődik. Az első lépésben a hosszabbítandó peptid N-terminálisáról eltávolítjuk a védőcsoportot. Második lépésben hozzákapcsoljuk az N-terminálisán és – ha szükséges –

oldalláncán védett és C-terminálisán aktivált aminosavat az előzőekben szabaddá vált aminocsoporthoz. Az aminosavak kapcsolásához megfelelő védelemmel kell ellátni a reaktív oldalláncokat és a terminális funkciós csoportokat. A védőcsoportok legfontosabb tulajdonsága a szelektivitás és a könnyű lehasíthatóság. Megfelelő védőcsoportkombinációkkal a szükséges funkciós csoportok szelektíven, a kívánt sorrendben szabadíthatók fel.

A tervezett peptidek szintézise során folyadékfázisú peptidszintézist alkalmaztam. A szintézis során komoly probléma a peptidkötés kiépítésére alkalmazott módszer kiválasztása. Az ideális kapcsolással szemben támasztott követelmények: gyors, mellékreakciók nem kísérik, kvantitatív kitermelést eredményez.

Peptidek oldatfázisú szintézise akkor vihető végbe hatékonyan, ha nem az adott aminosav szabad karboxilcsoportján keresztül történik a kondenzáció, hanem annak egy aktivált karbonilszármazékán:



ahol X egy elektronszívó és jó távozó csoport.

A leggyakrabban alkalmazott aktiválási, kapcsolási módszerek a következők:

- azidos kapcsolás
- savkloridos kapcsolás
- karbodiimides módszer
- vegyesanhidrides acilezés
- szimmetrikus anhidrides kapcsolás
- aktívészteres kapcsolás
- *in situ* aktívészteres kapcsolás

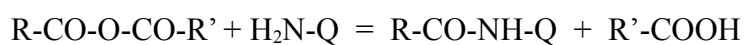
Munkám során az aktívészteres, az *in situ* aktívészteres és a vegyesanhidrides kapcsolási módszereket alkalmaztam, így itt csak ezekről írok bővebben.

Jó távozó csoport beépítése a molekulába kulcsfontosságú. Az úgynevezett aktívészteres kapcsolási technika során gyakran például szubsztituált fenilésztereket,

pentaklórfenil- vagy pentafluorfenil-észtereket alkalmaznak. Az előállítás során minimális a racemizáció valószínűsége, és hűtve a kristályos aktívészter hosszan eltartható.

Az úgynevezett *in-situ* aktívészteres kapcsolás során az aktívészter származék izolálása nem történik meg. Ennek két oka lehet: az egyik esetben az egyszerűbb kivitelezés miatt nem szükséges izolálni, a másik esetben pedig nem is tudnánk, mert a termék annyira aktív, hogy izolálás közben elbomlana. Utóbbira példa az N,N'-diciklohexil-karbodiimid (DCC) jelenlétében, 1-hidroxi-benzotriazollal (HOBt) való kapcsolás.

A vegyesanhidrides kapcsolás lényegét kifejező egyenlet a következő:



R': például C₂H₅O-; (CH₃)₂-CH-CH₂-O-; (CH₃)₃C-O-

A módszer előnye a gyorsasága, az egyszerű feldolgozhatóság, jó kitermelés, de hátránya, hogy fennáll a racemizáció veszélye, továbbá, hogy a reakció során a hőmérsékletet –5 °C körül kell tartani, mert 0 °C-on a vegyesanhidrid diszproporcionálódik (ezért nincs is mód az izolálására).

3. Célkitűzés

Célul tűztem ki szeril-szerin dipeptidek szintézisét és komplexképző sajátságainak felderítését elektrospray ionizációs tömegspektrometria alkalmazásával. A szerin különleges komplexképző tulajdonsága évek óta a tömegspektrometriás kutatások középpontjában van. Elektrospray ionizáció alkalmazásával a szerin aminosav optikailag tiszta oldatából ugyanis egy jellegzetes, oktamer szerkezetű komplex detektálható, amelyben egyes aminosavak kiro szelektív módon más aminosavakra és kismolekulákra is kicserélhetőek. A jelenség akár a földi élet kialakulásában is szerepet játszhatott.

Kutatómunkám során célul tűztem ki annak felderítését, hogy a szerin „mágikus” oktamerképzése átvihető-e nagyobb molekulákra. Tervezett munkám során két dipeptid folyadékfázisú szintézisét tűztem ki célul: a két azonos konfigurációjú szerin aminosavból felépülő L-Ser-L-Ser dipeptid, valamint az ellentétes konfigurációjú aminosavakból felépülő L-Ser-D-Ser dipeptid szintézisét. Munkám során három alternatív szintetikus útvonalat terveztem kipróbálni a tömegspektrometriás mérésekhez szükséges nagy tisztaságú peptidek előállítására.

A két peptid komplexképző sajátságainak vizsgálatát elektrospray ionizációs tömegspektrometriával terveztem megvalósítani. Céлом volt annak felderítése is, hogy a szerin oktamer szerkezetű nemkovalens komplexében vajon helyettesíthetők-e egyes építőelemek szeril-szerin dipeptiddel.

4. Kísérleti rész

Általános megjegyzések

A szintézishez felhasznált kiindulási anyagokat (Iris Biotech - Marktreidwitz, Németország); Sigma-Aldrich Kft. - Budapest, Magyarország), az oldószereket (Molar Chemicals - Budapest, Magyarország) kereskedelmi forgalomban szereztük be.

Folyadékfázisban történő szintézisek során a reakciók követése

Vékonyréteg-kromatográfia:

A reakciók nyomon követése MERCK-féle (Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60, Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254) lapokon végzett vékonyréteg-kromatográfiás futtatással történt. Az előállított anyagok retenciós faktorai az alsó indexben feltüntetett eluensre vonatkoznak. Az alkalmazott futtatóelegyek a következők voltak:

1. EtOAc : MeOH = 2 : 1
2. EtOAc : MeOH = 2 : 3
3. törzsoldat*: EtOAc = 1 : 2
4. törzsoldat*: EtOAc = 2 : 1
5. törzsoldat*: EtOAc = 1 : 7
6. EtOAc : ciklohexán = 1 : 2
7. EtOAc

*törzsoldat összetétele - piridin : jégcet : víz = 20 : 6 : 11

Alkalmazott előhívószerek vékonyréteg kromatográfia esetén

Ninhydrin-teszt:

3 %-os ninhydrin acetonos oldata, az előhívandó kromatogramot ebbe az oldatba mártjuk, majd 5 percre 100 °C-os szárítószekrénybe helyezzük.

Tolidin-teszt:

8,3 g kálium-jodidot tartalmazó 100 ml 2,5 %-os ecetsav-oldathoz hozzáadunk 100 ml 2 %-os etanolos tolidin-oldatot. A kromatogramot pár percre klórfürdőbe (KMnO₄-ból és

33%-os HCl-ből frissen elkészített) helyezzük, majd szellőztetés után tolidin-reagenssel lefűjva előhívjuk.

4.1. Stratégiák a folyadékfázisú peptidszintézishez

Munkám során három alternatív szintetikus útvonalat is kipróbáltam:

- aktívészteres kapcsolással
- *in situ* aktívészteres kapcsolással
- vegyesanhidrides kapcsolással

4.1.1. H-L-Ser-L-Ser-OH dipeptid szintézise aktívészteres kapcsolással

A munka során első lépésben az aminosocportján terc-butiloxokarbonil (Boc) védőcsoporttal rendelkező L-serin-pentaklórfenilészter (OPcP) származékát állítottam elő. A második reakciólépésben történt az aktívészter kapcsolása a védetlen aminosavhoz.

Boc-L-Ser-OPcP előállítás

4,1g [20,0 mmol] Boc-L-Ser-OH-t oldottam 50 ml dimetilformamidban (DMF), és hozzáadtam előzőleg 5 ml DMF-ban feloldott, 5,3g [20,0 mmol] pentaklórfenol oldatát. Az elegyet állandó kevertetés mellett külső jeges hűtés alkalmazásával lehűtöttem. 4,1g [20,0 mmol] DCC-t feloldottam 100 ml térfogatú DMF-ban és hozzáadtam a lehűtött elegyhez. A reakció egy órán keresztül jeges hűtés mellett, majd egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten zajlott, kevertetés mellett. A reakció előrehaladását vékonyréteg-kromatográfiával követtem. 24 óra elteltével a reakcióelegyben még detektálható volt a kiindulási anyag, így újabb 0,8 g [3,9 mmol] DCC-t adtam hozzá. Újabb 24 óra elteltével a reakció során keletkező, és szilárd formában kiváló diciklohexil ureát (DCU) az elegyből kiszűrtem. A tiszta oldathoz három csepp ecetsavat adtam - az esetlegesen el nem reagált DCC elreagáltatása céljából - és rotációs vákuumbepárlóval bepárooltam. A keletkező olajra 50 mL dietilétert öntöttem, majd az ekkor kiváló DCU-t újra kiszűrtem. A termék tiszta éteres oldatából megkísértem a termék kristályosítását. Bár a kísérletek során sokféle oldószert és oldószerkeletet kipróbáltam (például: petroléter; etilacetát-petroléter elegy;

etanol-petroléter elegy; aceton; aceton-ciklohexán elegy), a termék kristályos formában nem vált ki, így a keletkező olajszerű anyaggal dolgoztam tovább (3. ábra).

Kitermelés_{nyertermék}: 8,9g, (98,1 %)

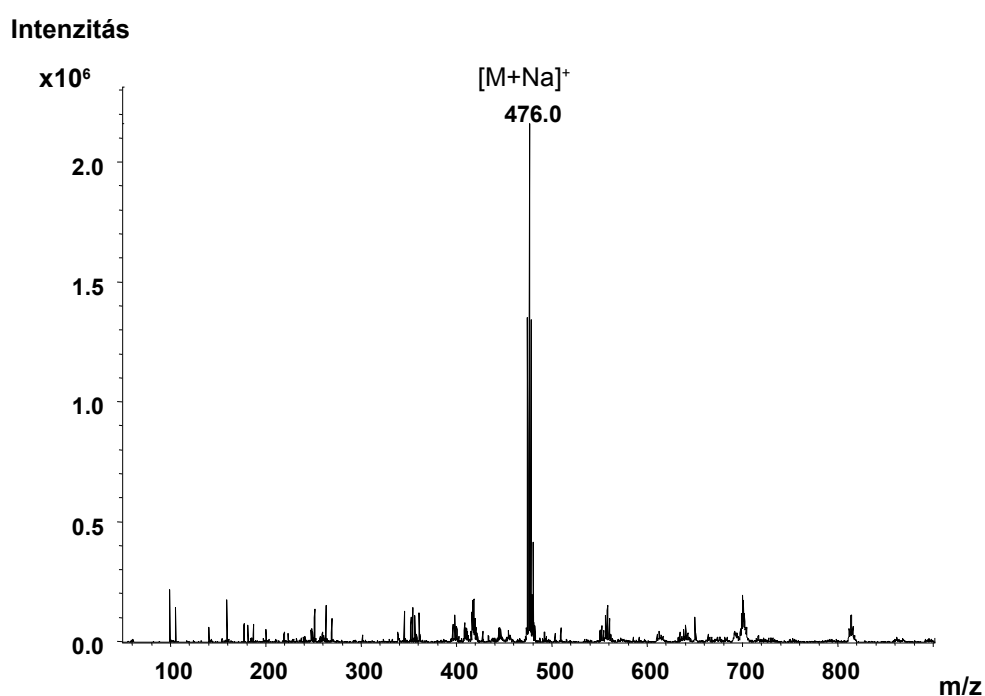
$R_{F6} = 0,62$

A terméket vékonyrétegekromatográfiás elválasztást követően tömegspektrometria alkalmazásával azonosítottam. A kísérleti technikát részletesen bemutatom a 4.2. fejezetben.

Összegképlet: $C_{14}H_{14}O_5NCl_5$

Elméleti monoizotópos molekulatömeg: 450,9

Mért monoizotópos molekulatömeg : 451,0



3.ábra: Boc-L-Ser-OPcP ESI-MS tömegspektruma

Boc-L-Ser-L-Ser-OH dipeptid előállítása

Az előző lépésben előállított Boc-L-Ser-OPcP-ből 1,35g-ot [3,0 mmol] feloldottam 30 ml DMF-ban. Hozzáadtam előzőleg 5 ml DMF-ban feloldott, 0,3g [3,0 mmol] mennyiségű L-szerint. 24 órán keresztül, szobahőmérsékleten, állandó kevertetés mellett folyt a reakció, amelynek előrehaladását vékonyréteg-kromatográfiával követtem. 24 óra elteltével a reakcióelegyet leszűrtem, rotációs vákuumbepárló segítségével bepároltam, és 30 ml etil-acetátot (EtOAc) adtam hozzá annak érdekében, hogy a terméket kikristályosíthassam. A vékonyréteg-kromatográfiával elválasztott komponenseket tömegspektrometria segítségével azonosítottam. Bár a vékonyréteglapon azonosítható volt a várt vegyület, a reakció során felszabaduló pentaklórfenol nagy mennyiségben jelen volt a kapott termékben. Mivel ennek eltávolítása a következő reakciólépés után is nehézségbe ütközött volna, így egy másik szintézismódszert próbáltam ki a dipeptid kellő tisztaságban történő előállítására.

4.1.2. H-L-Ser-L-Ser-OH dipeptid szintézise *in situ* aktívészteres kapcsolással

A második szintézispróba során az aminos csoportján terc-butiloxikarbonil (Boc) védőcsoporttal rendelkező L-szerint reagáltattam az L-serin metilészterével, *in situ* aktívészteres reakcióban diciklohexil-karbodiimid és 1-hidroxi-benztriazol segítségével. A munka során első lépésben a védett dipeptidet állítottam elő, majd abból a második lépésben terveztem a metilészter védőcsoport eltávolítását, majd utolsó lépésben a Boc védőcsoport eltávolítását.

Boc-L-Ser-L-Ser-OMe előállítása

2,15g [10,0 mmol] Boc-L-Ser-OH-t, 1,62g [12,0 mmol] HOBt-t és 2,48g [12,0 mmol] DCC-t feloldottam 20 ml DMF oldószerben. Jeges-vizes hűtés és állandó kevertetés mellett 30 percen keresztül folyt az aminosav előaktiválása. Eközben 1,87g [12,0 mmol] L-Ser-OMe x HCl-t oldottam 10ml DMF-ban és 1,32 ml [12,0 mmol] N-metil-morfolint (NMM) adtam hozzá, külső jeges hűtés mellett. Az N-metil-morfolin hozzáadására a hidroklorid só felszabadítása miatt volt szükség. Az előaktiválási idő (30 perc) után a két oldatot összeöntöttem. A reakció ezután 30 percen keresztül jeges hűtés mellett, majd szobahőmérsékleten zajlott. 24 óra elteltével az oldatot szűrtem és bepároltam. A keletkező

terméket 50 ml EtOAc-ban feloldottam, majd kiráztam 3 x 15 ml desztillált vízzel. Ezt követte a kirázás 15-15 ml, 1N sósav oldattal (háromszor), 10% NaHCO₃ oldattal (háromszor), végül 30%-os NaCl oldattal (háromszor). Az etilacetátos fázist MgSO₄-on szárítottam. A szárítószer kiszűrése után az oldatot vákuumban bepároltam. Az terméket és a kirázás során nyert vizes oldatokat vékonyréteg-kromatográfiával vizsgáltam és az egyes foltokat tömegspektrometria segítségével azonosítottam. Az analitikai vizsgálatok kimutatták, hogy bár valóban keletkezett a kívánt termék, számos nagyobb molekulatömegű, nem várt komponens is keletkezett.

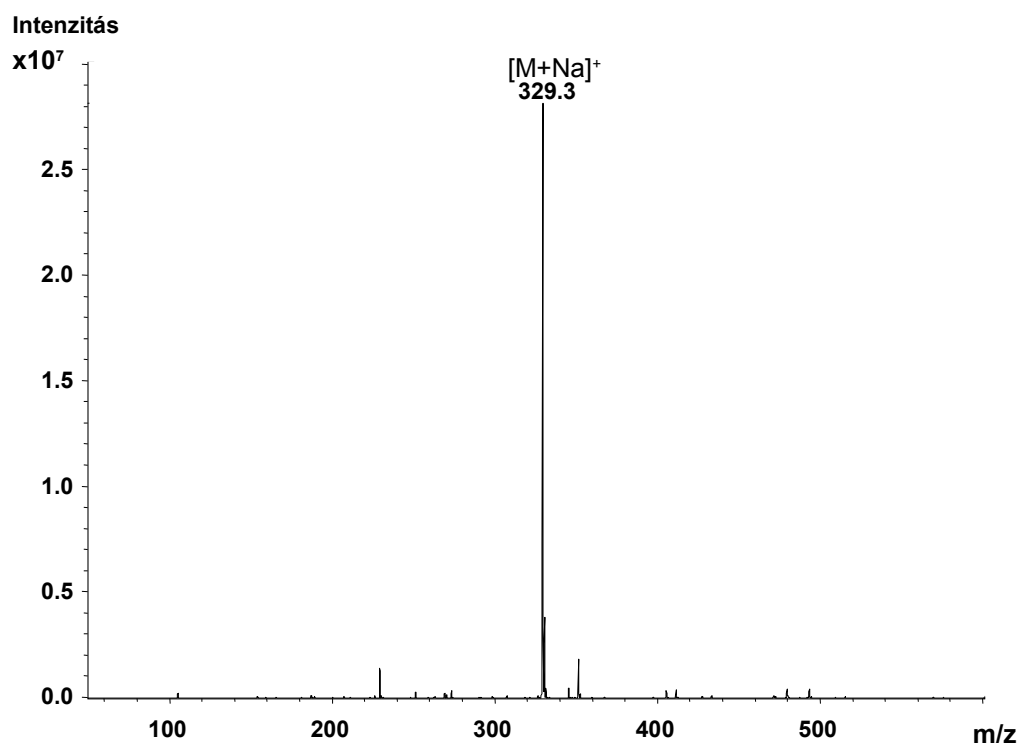
Kitermelés_{nyerstermék}: 2,5 g (81,7 %)

R_{F7} = 0,55

Összegképlet: C₁₂H₂₂O₇N₂

Elméleti monoizotópos molekulatömeg: 306,2

Mért monoizotópos molekulatömeg : 306,3



4.ábra: Boc-L-Ser-L-Ser-OMe ESI-MS tömegspektruma

4.1.3. H-L-Ser-L-Ser-OH x TFA dipeptid szintézise vegyesanhidrides kapcsolással

Boc-L-Ser(^tBu)-L-Ser-OMe előállítása

1,3g [5,0 mmol] Boc-L-Ser(^tBu)-OH-t feloldottam 20ml DMF-ban, majd hozzáadtam 0,78 ml [6,0 mmol] klórhangyasav-izobutílesztet és 0,66ml [6,0 mmol] NMM-et és 25 percig kevertettem -10°C -ra hűtve az elegyet. Eközben 0,93g [6,0 mmol] L-Ser-OMe x HCl-ot feloldottam 15 ml DMF-ban és 0,66 ml [6,0 mmol] NMM-t adtam hozzá, -10°C-os hűtés mellett. Ezután a két elegyet egyesítettem. A reakciót szobahőmérsékleten kevertettem 60 percig, majd éjszakára jégszekrényben hagytam állni. Másnap a reakcióelegyet leszűrtem (NMM x HCl kiszűrése) és bepároltam. A bepárlási maradékhoz 40 ml etilacetátot adtam és háromszor 10 ml vízzel, háromszor 15 ml 1N HCl-al valamint háromszor 15 ml 10%-os NaHCO₃ oldattal kiráztam. A kirázást követően az etilacetátos fázist MgSO₄-on szárítottam. Egy óra múlva a szárítószeret redős szűrővel leszűrtem és az oldatot bepároltam.

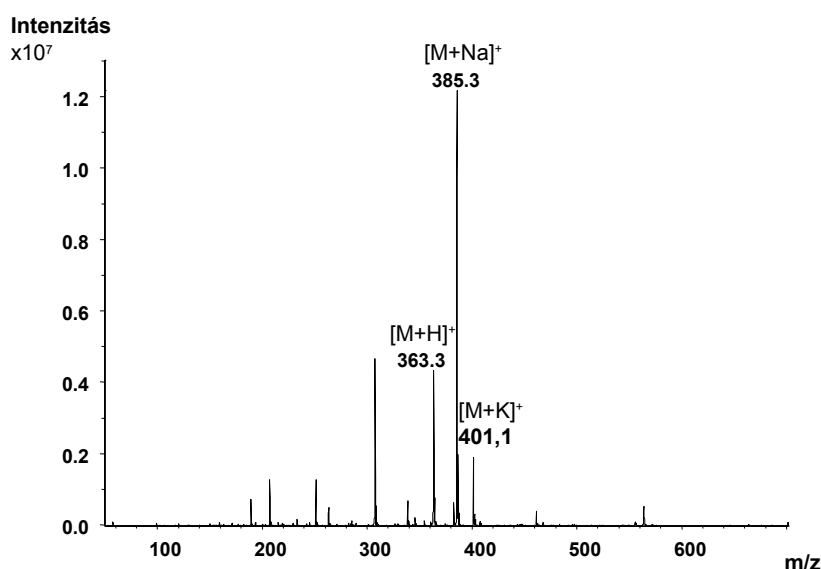
Kitermelés_{nyertermék}: 1,6g (88,4 %)

R_{F7} = 0,70

Összegképlet: C₁₆H₃₀O₇N₂

Elméleti monoizotópos molekulatömeg: 362,2

Mért monoizotópos molekulatömeg: 362,3



5. ábra: Boc-L-Ser(^tBu)-L-Ser-OMe ESI-MS tömegspektruma

Boc-L-Ser(^tBu)-L-Ser-OH előállítása

Az első lépésben nyert termékhez 15 ml dioxánt és 5 ml vizet adtam. Ezután szobahőmérsékleten történő kevertetés mellett hozzáadtam 2 ekvivalens NaOH [8,9 mmol] vizes oldatát. 2 órán keresztül zajlott a reakció. A reakció előrehaladását VRK-val követtem. A reakció lezajlása után az oldat pH-ját 1N HCl oldattal körülbelül 6-ra állítottam. Az oldatot EtOAc-al kétszer extraháltam. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottam. Szűrés után bepároltam, a maradék olajat éterrel eldörzsöltem.

A VRK-s elválasztás és a tömegspektrometriás analízis azt mutatta, hogy a termék egységes és megfelel a várt szerkezetnek.

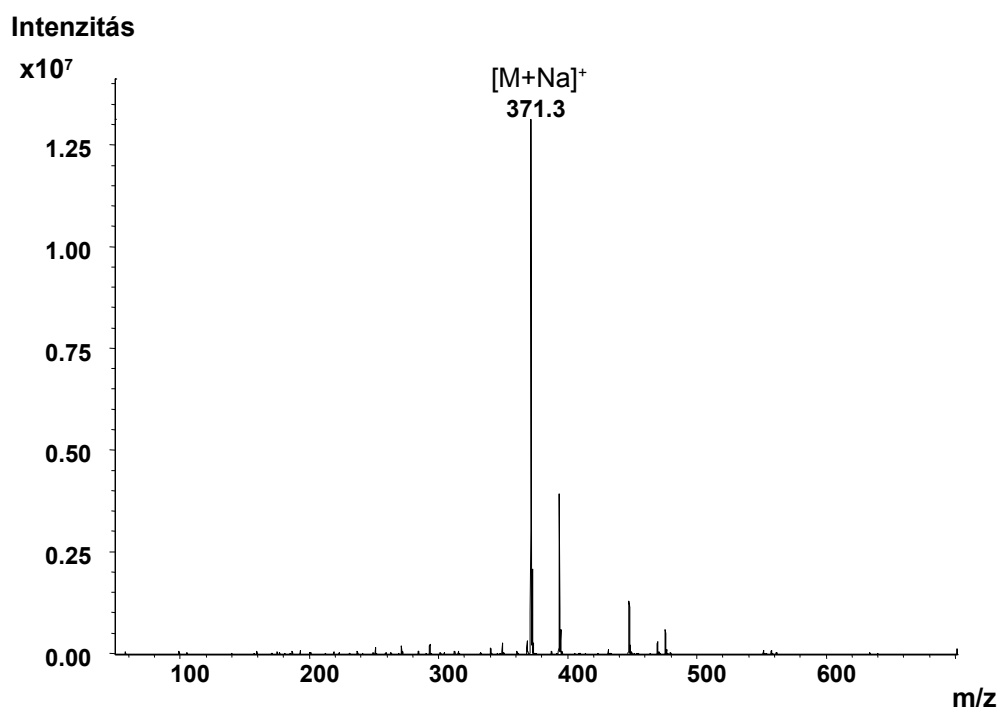
Kitermelés_{Snyertermék}: 1,4g (76,1 %)

R_{F7} = 0,62

Összegképlet: C₁₅H₂₈O₇N₂

Elméleti monoizotópos molekulatömeg: 348,2

Mért monoizotópos molekulatömeg: 348,3



6. ábra: Boc-L-Ser(*t*Bu)-L-Ser-OH ESI-MS tömegspektruma

H-L-Ser-L-Ser-OH x TFA előállítása

Az előző reakcióban nyert termékhez 13ml trifluor-ecetsavat adtam. A reakció 3 órán keresztül szobahőmérsékleten zajlott. A reakció lejátszódását negyed óránként vett mintákkal VRK-val követtem. Három óra után a reakció teljesen végbement, így az oldatot bepároltam. A TFA maradékának eltávolításához dietilétert adtam hozzá, és újra bepároltam. Ezt a bepárlási lépést háromszor megismételtem.

A vékonyrétegkromatográfiás elválasztás és a tömegspektrometriás analízis azt mutatta, hogy a termék egységes és megfelel a várt szerkezetnek (7. ábra). A keletkező terméket desztillált vízben feloldottam és liofilizáltam.

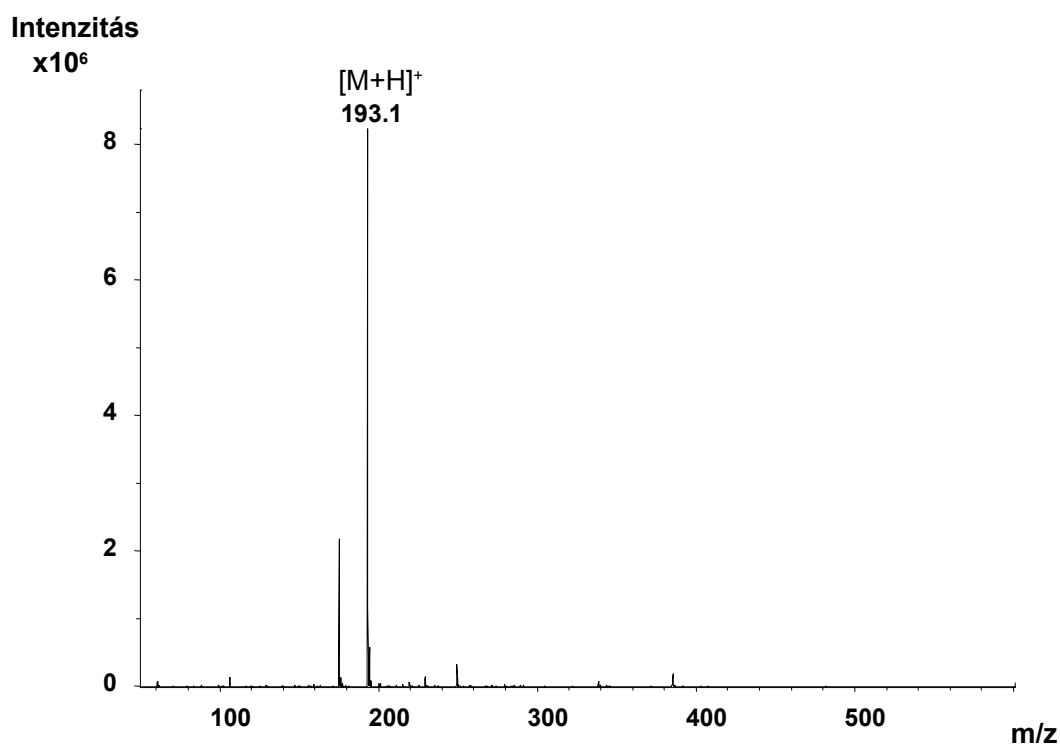
Kitermelés: 0,86g (89,6 %)

$R_{F7} = 0,61$

Összegképlet: $N_2C_6O_5H_{12}$

Elméleti monoizotópos molekulatömeg: 192,1

Mért monoizotópos molekulatömeg: 192,1



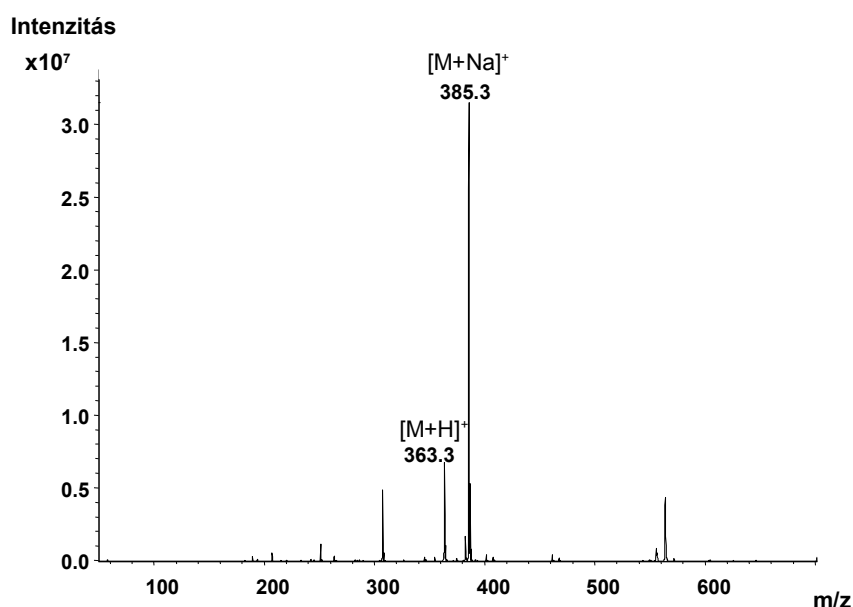
7.ábra: H-L-Ser-L-Ser-OH ESI-MS tömegspektruma

4.1.4. H-L-Ser-D-Ser-OH x TFA dipeptid szintézise vegyesanhidrides kapcsolással

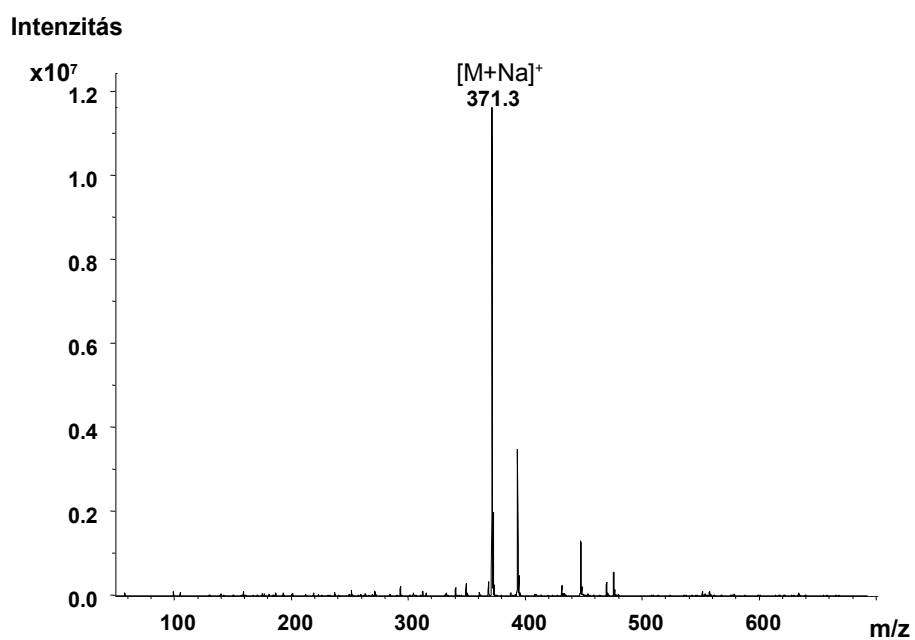
Mivel a harmadik szintézispróba során sikerült az H-L-Ser-L-Ser-OH dipeptidet legnagyobb tisztasággal előállítani, így ezt a módszert választottam az H-L-Ser-D-Ser-OH dipeptid előállítására is. A munka során az aminocsoportján Boc védőcsoporttal rendelkező, valamint az oldalláncán tercier-butil-éter formában védett L-szerinből (Boc-L-Ser('Bu)-OH) indultam ki, és reagáltattam a D-szerin metilészterével, klórhangyasav-izobutilészter alkalmazásával történő vegyesanhidrides típusú reakció alkalmazásával. Az előzőekben bemutatott módszer analógiájára első lépésben a védett dipeptidet állítottam elő. Második lépésben lúgos hidrolízissel eltávolítottam a metilészter védőcsoportot, majd az utolsó lépésben a Boc és a 'Bu védőcsoportokat TFA-val távolítottam el. Az egyes lépések kitermelési adatait az *1. táblázat* tartalmazza. A tömegspektrumokat a *8-10. ábrán* mutatom be.

	Kitermelés	Elméleti monoizotópos molekulatömeg	Mért monoizotópos molekulatömeg
Boc-L-Ser('Bu)-D-Ser-OMe	88%	362,2	362,3
Boc-L-Ser('Bu)-D-Ser-OH	86%	348,2	348,3
L-Ser-D-Ser x TFA	75%	192,1	192,1

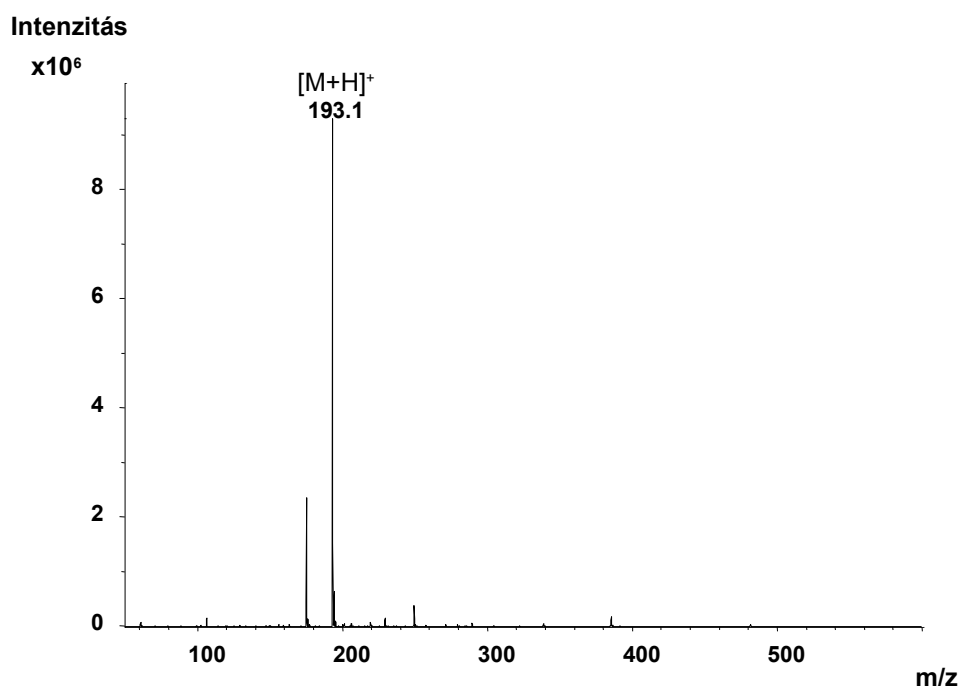
1. táblázat: A H-L-Ser-D-Ser-OHxTFA dipeptid szintézisének egyes lépéseinek kitermelési és analitikai adatai



8. ábra: Boc-L-Ser('Bu)-D-Ser-OMe ESI-MS tömegspektruma



9. ábra: Boc-L-Ser(^tBu)-D-Ser-OH ESI-MS tömegspektruma



10. ábra: H-L-Ser-D-Ser-OH ESI-MS tömegspektruma

4.2. Vékonyrétegkromatográfiás reakciókövetés tömegspektrometriás detektálással

A reakciók lejátszódását nemcsak a vékonyréteglapok előhívásával és vizuális értékelésével ellenőriztem, hanem az előhívást tömegspektrometriás analízissel, molekulatömeg-meghatározással is kombináltam. Az előhívott vékonyréteglapok a használt reagensek miatt tömegspektrometriás analízisre már nem alkalmasak. A kísérletek során így a következő megoldást alkalmaztam: a vékonyréteglapra szimmetrikusan, egymás mellett háromszor felcseppentettem a mintát, és a szokásos módon felfuttattam. A lapot száradás után középen (a középső foltok megfelelő pozíció közepén) félbevágtam. Az egyik felét a hagyományos előhívószerekkel előhívtam. A lap másik felén az előhívott részlet alapján pozicionálva a várható foltokat, a lapról egy kevés szilikagél eltávolítottam és egy Eppendorf-csőbe helyeztem. A szilikagél egy kis morzsájához 200 µl térfogatú oldószerkeletet adtam (acetonitril:víz=1:1, 0,1% ecetsav (V/V)), alaposan összeráztam, majd centrifugáltam. A felülúszót a tömegspektrométerbe injektáltam és felvettem az oldat spektrumát. A várható foltok vizsgálata előtt felvettem a szilikagél oldatának spektrumát. A kapott csúcsokat a későbbi vizsgálatok során figyelembe vettem, mint a mintához nem tartozó háttérionok.

A kísérletek során minden esetben elvégezhető volt a vékonyréteglapról a tömegspektrometriás molekulatömeg-meghatározás. Az általam használt mérési módszer csupán néhány percet vesz igénybe, a két technika együttes használata így nagyon hatékony analitikai módszernek bizonyult.

4.3. Tömegspektrometriás mérések

Kísérleteim során a tömegspektrumokat egy Bruker Esquire 3000+ típusú, ioncsapdás tömegspektrométeren vettem fel elektropray ionizáció alkalmazásával. Molekulatömeg mérésekhez a mintákat acetonitril-víz = 1:1, 0,1% ecetsav (V/V) oldószerkeletben oldottam fel. Mérési paraméterek: porlasztógáz: 10 psi, szárítógáz: 4 l/perc, fűtött kapilláris hőmérséklete: 250 °C.

Komplexbépzés tanulmányozására a mintákat 0,01M koncentrációban metanol-víz 1:1, 0,1% hangyasav (V/V) oldószerkeletben oldottam fel. (Kivéve ha a szövegben másképp jelzem.) Optimalizált mérési paraméterek: porlasztógáz: 80 psi, szárítógáz: 0,5

l/perc, fűtött kapilláris hőmérséklete: 250 °C. Mérési pontonként három párhuzamos spektrumot vettem fel.

5. Eredmények

5.1. Peptidszintézis

Munkám során a tervezett dipeptidek előállítására három alternatív szintetikus útvonalat próbáltam ki:

- aktívészteres kapcsolás pentaklórfenil-észter származékon keresztül
- *in situ* aktívészteres kapcsolás DCC és HOBt jelenlétében
- vegyesanhidrides kapcsolás klórhangyasav-izobutilészter alkalmazásával.

A termékek analitikai jellemzésére vékonyrétegkromatográfiát alkalmaztam, amelyet elektropray ionizációs tömegspektrometriával kombináltam. Az eredmények azt mutatták, hogy vegyesanhidrides kapcsolással nyertem a legnagyobb tisztaságú terméket, így a tömegspektrometriás mérésekhez mindkét peptidet ezzel a módszerrel állítottam elő.

A előállított két dipeptid analitikai adatai:

Peptid	Elméleti monoizotópos molekulatömeg	Mért monoizotópos molekulatömeg
H-L-Ser-L-Ser-OH	192,1	192,1
H-L-Ser-D-Ser-OH	192,1	192,1

2. táblázat: Az előállított két dipeptid adatai

5.2. A szerin komplexképzésének tömegspektrometriás vizsgálata

A dipeptidek komplexképzését a szerin komplexképzésével terveztem összehasonlítani. Kísérleteim során optimalizáltam a szerin nemkovalens komplexeinek tömegspektrometriás úton történő detektálását. A szokványos molekulatömegmérésekhez beállított tömegspektrométerekkel nem, vagy csak igen alacsony intenzitással tudunk a spektrumokban nemkovalens komplexeket detektálni. Amennyiben gyenge másodlagos kötésekkel összetartott komplexeket, klasztereket szeretnénk vizsgálni, minden esetben

szükség van a mérési paraméterek pontos beállítására. Kísérleteim során három meghatározó mérési paraméter spektrumra gyakorolt hatását tanulmányoztam részletesebben:

- oldószer összetétele
- porlasztógáz áramlási sebessége
- szárítógáz áramlási sebessége

Az optimalizáció során a szerin oktamer és más klaszterionok intenzitásváltozását követve olyan mérési körülményeket kerestem, ahol a nagyobb tömegű, protonált klaszterionok intenzitása kiemelkedő a spektrumban.

A megjelenő klaszterionok számszerű jellemzésére két adatot használok: az átlagos klaszterméter (ACS) jellemzi a spektrumban megjelenő klaszterionok átlagolt tagszámát, az asszociáció mértékét. A klaszterek intenzitásának tagszámmal súlyozott összegének és a klaszterintenzitások összegének hányadosaként definiáljuk.

$$ACS = \frac{\sum_n n I_n}{\sum_n I_n}$$

ahol n az adott klaszter tagszáma, I pedig az intenzitása. Mennél nagyobb az ACS értéke, annál intenzívebb és nagyobb tagszámú komplexek jelentkeznek a spektrumban.

A szokatlanul kiugró intenzitással rendelkező ionok - mint például a szerin oktamer - számszerű jellemzésére a mágikus szám értéket használom, amelyet a szomszédos ionok intenzitása alapján a következő képlet alapján számolható:

$$MN_n = \frac{2 \times I_n}{I_{n-1} + I_{n+1}}$$

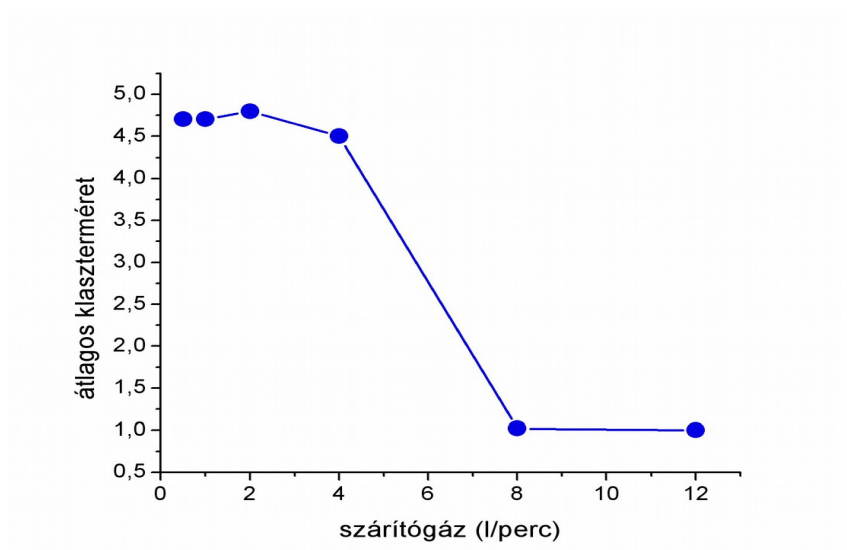
A mérések során négy különböző oldószer alkalmazásával mértem meg az L-szerin ESI-MS tömegspektrumát, 0.01M koncentrációban:

- acetonitril:víz = 1:1 (V/V)
- acetonitril:víz = 1:1, 0.1% hangyasavval (V/V)
- metanol:víz = 1:1 (V/V)
- metanol:víz = 1:1, 0.1% hangyasavval (V/V)

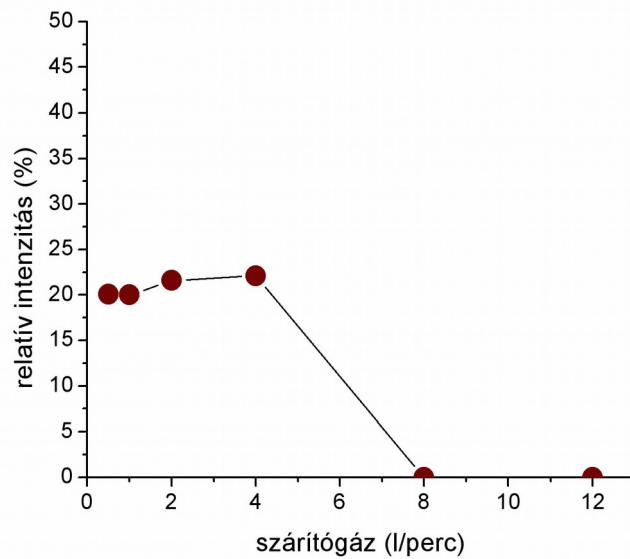
A mérések azt mutatták, hogy hangyasav hozzáadása kedvezően befolyásolja a spektrumok minőségét. Bár semleges oldatból is intenzív nemkovalens komplexet voltak detektálhatóak, ezek protonált és adduktionokból (Na^+ , K^+) együttesen álltak elő. A sokféle

ion megjelenése nehezíti a spektrumok értékelését. Hangyasav jelenlétében addukcionok csak elenyésző mértékben képződtek. Kismértékű különbség volt megfigyelhető a metanolt, illetve acetonitrit tartalmazó oldószer között: metanolos oldatban a komplexek intenzitása nagyobb volt. A vizsgált négyféle oldószer közül így a további mérésekhez a metanol:víz = 1:1, 0.1% hangyasav (V/V) elegyet választottam.

Vizsgáltam továbbá az ionizációhoz használt porlasztógáz (nebulizer gas) és szárítógáz (dry gas) mennyiségének hatását a nemkovalens komplexek megjelenésére. Tapasztalataim szerint mindkét paraméter drasztikus befolyásolja az ionok eloszlását és intenzitását a tömegspektrumban. Az átlagos klaszterméret és a szerin oktamer intenzitásának alakulása látható a szárítógáz áramlási sebességének függvényében a 11. ábrán:



11.ábra: Az átlagos klaszterméret változása a szárítógáz függvényében

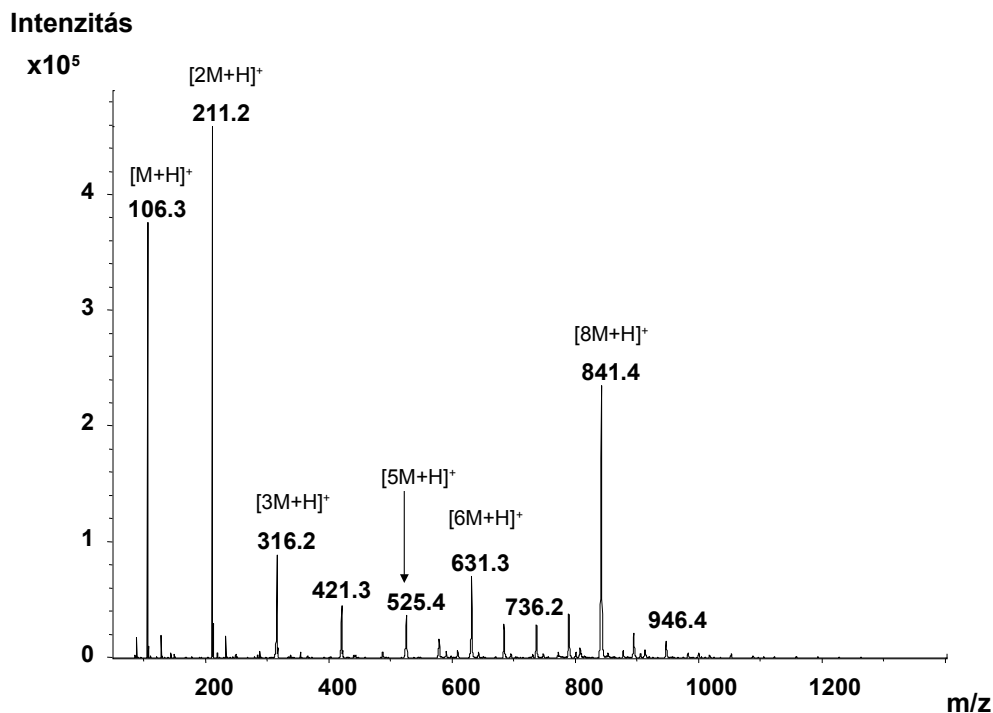


12.ábra: A szerin oktamer tömegspektrumban mérhető relatív intenzitásának változása a szárítógáz függvényében

A kísérletek során megfigyelhető volt, hogy a szárítógáz növelése csökkenti a nemkovalens komplexek intenzitását. 4 l/perc áramlási sebesség fölött a spektrumokban nem voltak detektálhatóak nemkovalens komplexek.

A porlasztógáz mennyisége a komplexek megjelenését kevésbé befolyásolta. Megfigyelhető volt, hogy a porlasztógáz növelése kismértékben segíti a komplexek képződését, a beállítható legmagasabb porlasztógáz értéknél (80 psi) volt a legintenzívebb az oktamer komplex csúcsa, így a kísérleteim további részében ezt az értéket használtam a mérések során.

Az L-szerin komplexeinek optimalizált tömegspektruma látható a 13. ábrán. A spektrumban kiemelkedő intenzitással detektálható az oktamer komplex csúcsa (841,4 m/z), amelynek MN értéke az alkalmazott mérési körülmények között: 8,52. A spektrumban az aminosav protonált monomerje (106,3 m/z) és protonált dimerje (211,2 m/z) mellett uralkodóan páros tagszámú, protonált klaszterionok azonosíthatóak: a protonált tetramer (421,3 m/z), hexamer (631,3 m/z) és az oktamer. Kisebb intenzitással jellegzetes, nagy tagszámú, két töltéssel rendelkező klaszterionok detektálhatóak: például $[13M+2H]^{2+}$: 683,8 m/z , $[15M+2H]^{2+}$: 788,8 m/z .

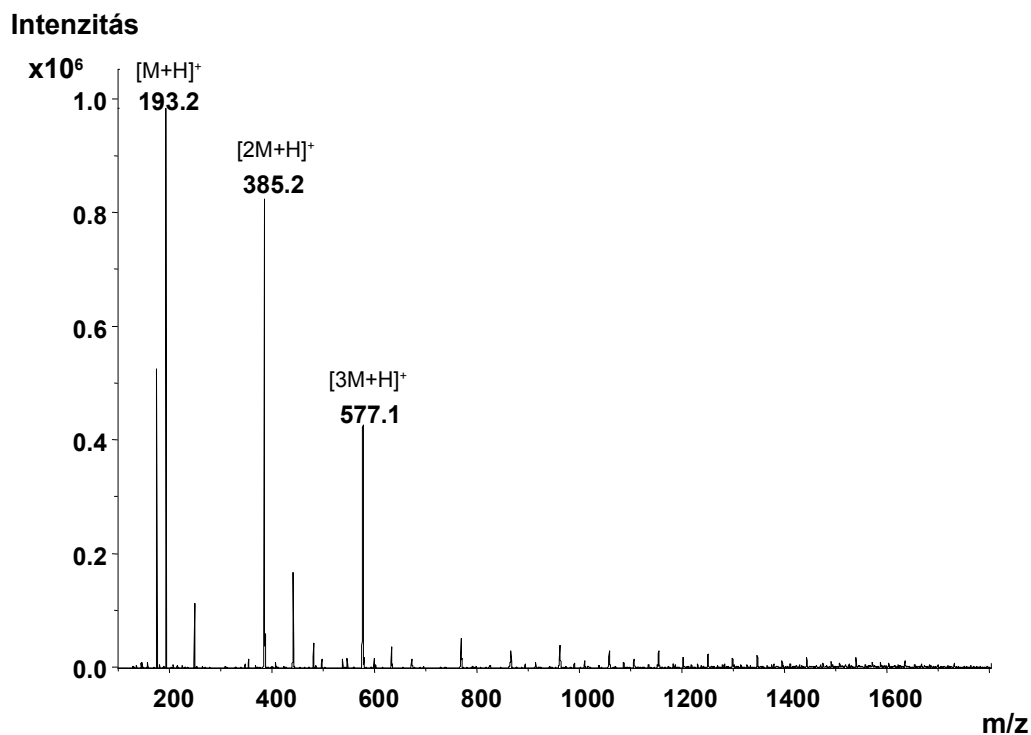


13.ábra: Az L-szerin komplexei

5.3. A dipeptidek komplexképzésének tömegspektrometriás vizsgálata

Az L-szerin esetén nyert, optimalizált mérési körülmények között vizsgáltam a két előállított dipeptid, a H-L-Ser-L-Ser-OH, valamint annak diasztereomerjének, a H-L-Ser-D-Ser-OH komplexképzését elektrospray ionizációs tömegspektrometria alkalmazásával.

A kísérletek során a peptidek 0.01M koncentrációjú, metanol:víz = 1:1, 0.1% hangyasav (V/V) elegyben készített oldatát mértem 80 psi porlasztógáz, valamint 0,5 l/perc szárítógáz alkalmazása mellett. Az alkalmazott körülmények között mindkét peptid jellegzetes nemkovalens komplexeket ad a tömegspektrumban (14.ábra). A legintenzívebb ionok a protonált monomer (193,2 *m/z*) mellett a protonált dimer (385,2 *m/z*) valamint a protonált trimer (577,1 *m/z*). Emellett változatos, nagyobb tagszámú, több töltéssel is rendelkező ionok is megfigyelhetők a spektrumokban.



14.ábra: Az L-Ser-L-Ser dipeptid nemkovalens komplexei

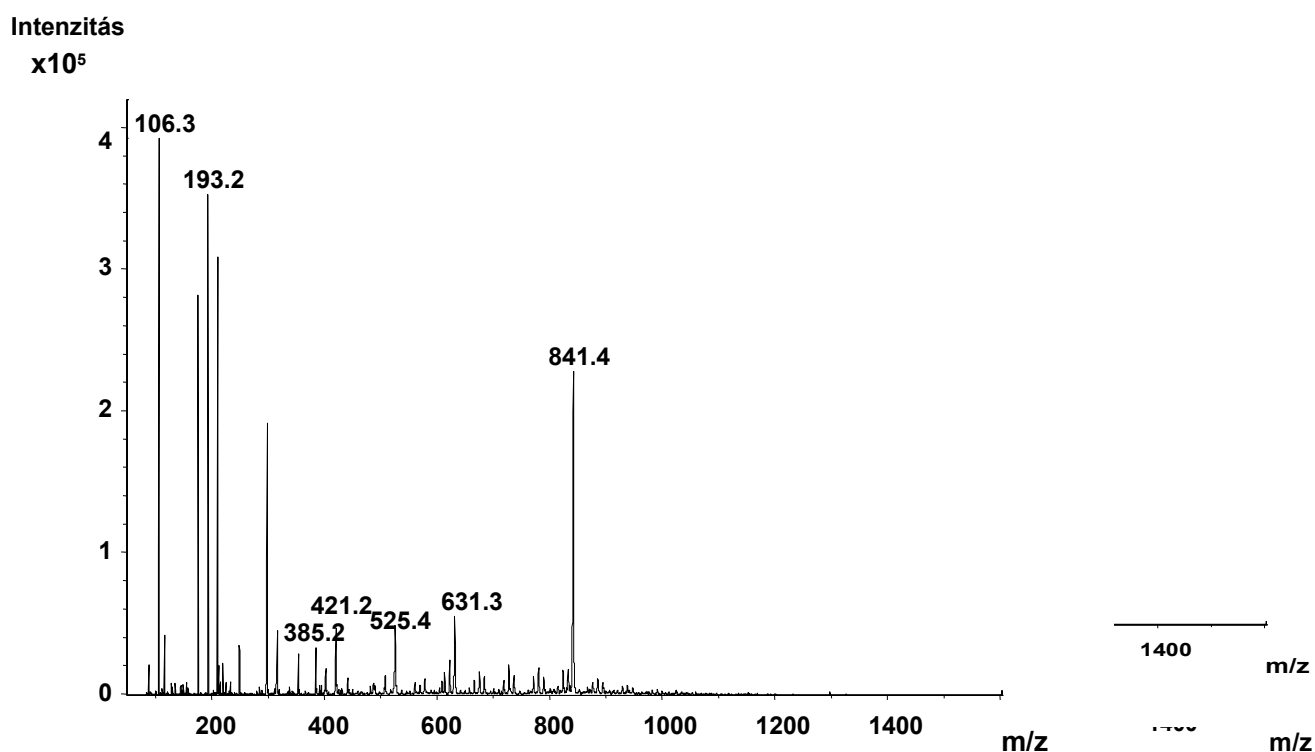
Nem detektálható azonban a spektrumokban kiugró intenzitású, a szerin oktamerhez hasonló mágikus komplex. A két dipeptid közel azonos spektrumot és ioneloszlást ad a vizsgált körülmények között:

A H-L-Ser-L-Ser-OH dipeptid ACS értéke: 2,4

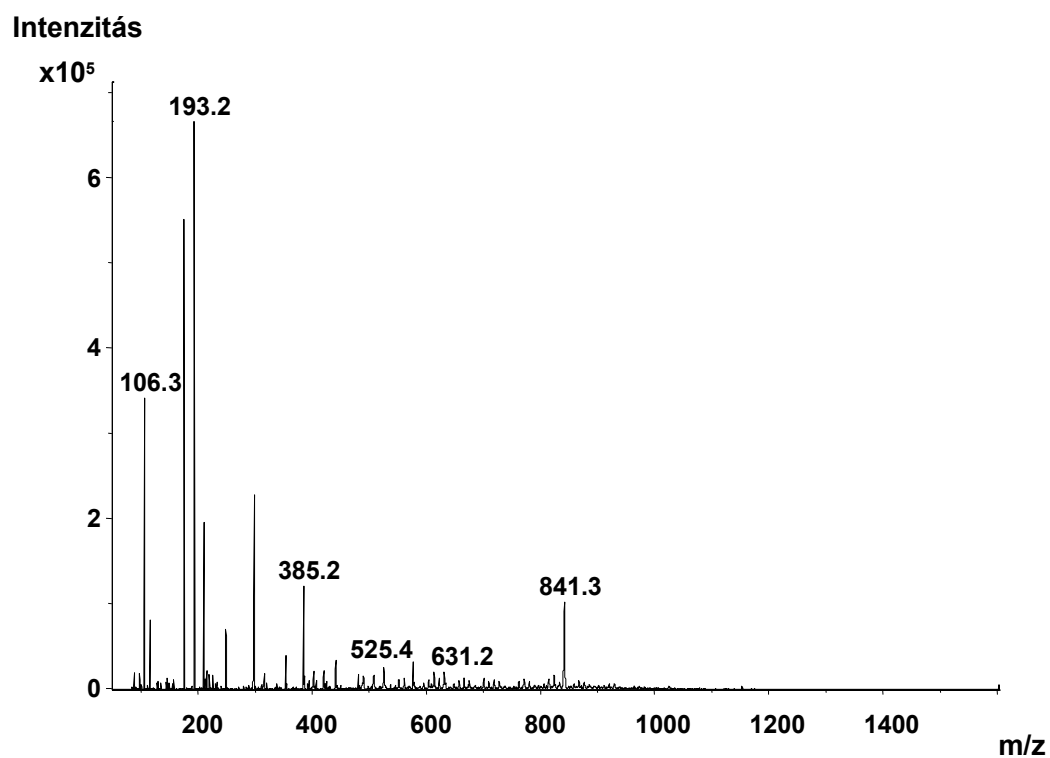
A H-L-Ser-D-Ser-OH dipeptid ACS értéke: 2,6

5.4. Helyettesítési próbák a szerin oktamerben

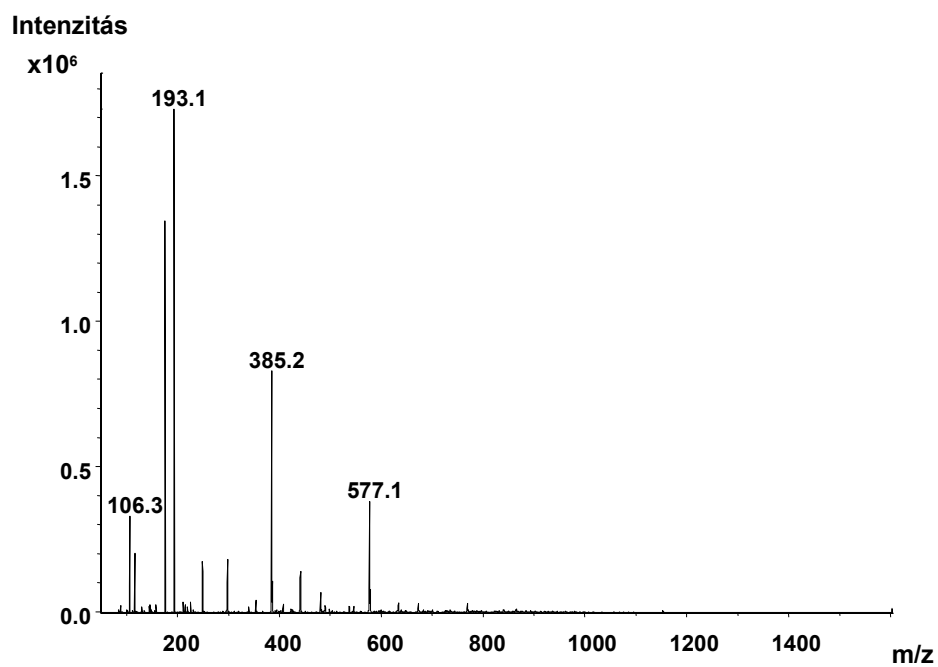
A helyettesítési próbák során azt vizsgáltam, hogy vajon a szerin oktamerben lecserélhető-e egy vagy több aminosav dipeptidre. A kísérletek során az L-szerin oldatát különböző arányban (9:1; 4:1 és 1:1) elegyítettem a H-L-Ser-L-Ser-OH dipeptid oldatával, és vizsgáltam a tömegspektrumban megjelenő klaszterionok összetételét, fókuszálva a szerin oktamer és más nagyobb tagszámú komplex megjelenésére. A mérési paraméterek megegyeztek a korábban alkalmazott értékkel (porlasztógáz: 80 psi, szárítógáz: 0,5 l/perc). A kapott spektrumok a 15., 16., 17. ábrákon láthatóak.



15. ábra: L-Ser és L-Ser-L-Ser 9:1 arányú elegyének spektruma



16. ábra: *L-Ser* és *L-Ser-L-Ser* 4:1 arányú elegyének tömegspektruma



17. ábra: *L-Ser* és *L-Ser-L-Ser* 1:1 arányú elegyének tömegspektruma.

A mérések során megfigyelhető volt, hogy a dipeptid mennyiségének növelésével arányosan csökken a tömegspektrumban a szerin oktamer intenzitása. A keverékek vizsgálata során semmilyen más nagyobb tagszámú komplexet nem lehetett megfigyelni. Eredményeim azt mutatják, hogy a szerin oktamer szerkezetű komplexében az egyes aminosavak nem helyettesíthetők szeril-szerin dipeptidekkel az alkalmazott mérési körülmények között.

5.5. Távlati tervek

Terveim között szerepel a D-Ser-L-Ser valamint a D-Ser-D-Ser dipeptidek szintézise és komplexképzésének vizsgálata annak érdekében, hogy behatóbban tudjam tanulmányozni a kiralitás komplexképzésre gyakorolt hatását.

A kísérletek folytatásaként célul tűztem ki a dipeptidek komplexképzésének tanulmányozását fémionok jelenlétében is. Hasonlóképpen, a szerin oktamerben végzett helyettesítési próbák során szeretném a komplexképzést fémionok jelenlétében is vizsgálni. Fontos megjegyezni, hogy az eddig detektált kiralitásfüggő helyettesítések esetén a spektrumokban fémionokkal képzett adduktionok jelentek meg a protonált komplexek helyett.¹³⁻¹⁴ Azt feltételezem, hogy a fémionoknak kulcsfontosságú szerepe lehet a komplexképzésben és a homokirális helyettesítési folyamatokban.

6. Összefoglalás

A kísérleteim során nagy tisztaságú H-L-Ser-L-Ser-OH és H-L-Ser-D-Ser-OH dipeptidet állítottam elő folyadékfázisú peptidszintézis alkalmazásával. A kipróbált három féle szintézisút (aktívészteres, *in situ* aktívészteres, valamint vegyesanhidrides) közül a vegyesanhidrides kapcsolási technika szolgáltatta a legjobb minőségű terméket.

Az előállított vegyületek analitikai jellemzésére a vékonyrétegkromatográfiát *off-line* megoldással elektropray ionizációs tömegspektrometriával kombináltam. Az általam használt kísérleti megoldás gyors és hatékony technikának bizonyult.

A kísérleteim során használt tömegspektrométerre optimalizáltam a szerin nemkovalens komplexekének detektálását. Az L-szerin vizsgálata során nyert ideális mérési paramétereket használtam az általam előállított két dipeptid komplexképzésének vizsgálatára.

Munkám során részletesen tanulmányoztam az L-Ser-L-Ser és az L-Ser-D-Ser dipeptidek komplexképzési hajlamát elektropray ionizációs tömegspektrometria alkalmazásával. Az eredményeim azt mutatták, hogy a két dipeptid jellegzetes nemkovalens komplexeket ad a tömegspektrumban. Nem volt azonban megfigyelhető az oktamerhez hasonló mágikus klaszterion. A szerin, valamint a szeril-szerin dipeptidek komplexképzési hajlamát a mágikus szám, valamint átlagos klaszterméret kiszámításával számszerűen jellemeztem.

Az L-Ser-L-Ser dipeptid alkalmazásával helyettesítési próbákat végeztem a szerin oktamer szerkezetű komplexében. Bár számos aminosavra és kismolekulára leírták, hogy helyettesíteni képesek egyes aminosavakat a szerin oktamerben, kísérleteim azt mutatták, hogy a mérési körülmények között nem történik meg az aminosavak dipeptidekre cserélődése.

Irodalomjegyzék

1. Cooks RG, Zhang D, Koch KJ, Gozzo FC, Eberlin MN: *Chiroselective self-directed octamerization of serine: implications for homochirogenesis*, **Anal. Chem.**, 73, 3646-3655 (2001)
2. Koch KJ, Gozzo FC, Zhang D, Eberlin MN, Cooks RG: *Serine octamer metaclusters: formation, structure elucidation and implications for homochiral polymerization*, **Chem. Commun.**, 1854-1855 (2001)
3. Counterman AE, Clemmer DE: *Magic number clusters of serine in the gas phase*, **J. Phys. Chem. B**, 105, 8092-8096 (2001)
4. Hodyss R, Julian RR, Beauchamp JL: *Spontaneous chiral separation in noncovalent molecular clusters*, **Chirality**, 13, 703-706 (2001)
5. Julian RR, Hodyss R, Kinnear B, Jarrold MF, Beauchamp JL: *Nanocrystalline Aggregation of Serine Detected by Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Origin of the Stable Homochiral Gas-Phase Serine Octamer*, **J. Phys. Chem. B**, 106, 1219-1228 (2002)
6. Schalley CA, Weis P: *Unusually stable magic number clusters of serine with a surprising preference for homochirality*, **Int. J. Mass Spec.** 221, 9-19 (2002)
7. Thomson JJ: *Rays of positive electricity*, **Proceedings of the Royal Society**, A 89, 1-20 (1913)
8. Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB: *Molecular beams of macroions*, **J. Chem. Phys.**, 49, 2240-2249 (1968)
9. Yamashita M, Fenn JB: *Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme*, **J. Phys. Chem.**, 88, 4451-4459 (1984)
10. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM: *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*, **Science**, 246, 64-71 (1989)
11. Loo JA: *Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry*, **Mass Spec. Rev.**, 16, 1-23 (1997)
12. Meng CK, Fenn JB.: *Formation of charged clusters during electrospray ionization of organic solute species*, **Org. Mass Spectrom.**, 26, 542 (1991)
13. Koch KJ, Gozzo FC, Nanita SC, Takats Z, Eberlin MN, Cooks RG: *Chiral transmission between amino acids: chirally selective amino acid substitution in the serine octamer as a possible step in homochirogenesis*, **Angew. Chem. Int. Ed.**, 41, 1721-1724 (2002)

14. Takats Z, Nanita SC, Cooks RG: *Serine octamer reactions: indicators of prebiotic relevance*, **Angew. Chem. Int. Ed.**, 42, 3521-3523 (2003)
15. Takats Z, Nanita SC, Schlosser G, Vekey K, Cooks RG: *Atmospheric pressure gas-phase H/D exchange of serine octamers*, **Anal. Chem.**, 73, 3646-3655 (2001)