

— TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT —

PETHŐ LILLA

**Alzheimer-kór diagnosztikájára alkalmas β -amiloid
epitóp peptidet tartalmazó konjugátumok szintézise**

Témavezető: Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadó

ELTE Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék

ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport



— Eötvös Loránd Tudományegyetem —

— Természettudományi Kar —

— Budapest, 2010 —

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Hudecz Ferenc tanszékvezető egyetemi tanárnak, a kutató csoport vezetőjének, hogy munkámat az ELTE Szerves Kémiai tanszékén, valamint az ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoportban lehetővé tette.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadónak, hogy tanácsaival és észrevételeivel irányította munkámat, és segítette dolgozatom elkészültét.

Köszönöm Szabó Ildikónak és Gali Irénnek a tömegspektrometriás mérések elvégzését.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Marilena Maneanak (University of Konstanz) a biokonjugátumok *in vitro* vizsgálatáért.

Végül külön köszönettel tartozom Dr. Bánóczy Zoltánnak és Hegedüs Rózsának, akik hasznos tanácsaira bármikor számíthattam és bármikor fordulhattam segítségért hozzájuk.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	1
Tartalomjegyzék.....	2
1 Bevezetés.....	4
2 Irodalmi áttekintés.....	6
2.1 Szövegtani elváltozások	6
2.1.1 Neurofibrilláris kötegek	7
2.1.2 Neurit plakkok.....	7
2.2 Amiloid prekursor protein	8
2.2.1 Amiloid kaszkád.....	9
2.3 Immunterápia.....	10
2.4 Peptidszintézis	13
2.4.1 A gyanta	15
2.5 A szilárdfázisú peptidszintézis stratégiái.....	16
2.5.1 Kapcsolási reakciók követése.....	19
2.6 ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....	20
2.7 Kutatási előzmények.....	22
3 Célkitűzések	25
4 Eredmények.....	27
4.1 Peptidek szintézise.....	28
4.1.1 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly] ₂ -NH ₂ (Ac-OT10-[Aβ(30-37)] ₂ -NH ₂) szintézise	28
4.1.2 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly] ₂ -NH ₂ (Ac-OT10-[Aβ(21-37)] ₂ -NH ₂) szintézise	30
4.1.3 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly] ₄ -NH ₂ (Ac-OT20-[Aβ(30-37)] ₄ -NH ₂) szintézise	31
4.1.4 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly] ₄ -NH ₂ (Ac-OT20-[Aβ(21-37)] ₄ -NH ₂) szintézise	33
4.2 Biológiai vizsgálatok: a konjugátumok ellenanyagkötő képességének vizsgálata ELISA módszerrel.....	35
4.3 Eredmények összefoglalása	37
5 Kísérleti rész.....	38
5.1 Peptidek szintézise.....	38
5.1.1 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly] ₂ -NH ₂ (Ac-OT10-[Aβ(30-37)] ₂ -NH ₂) előállítása, tisztítása, analízise	38
5.1.2 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly] ₂ -NH ₂ (Ac-OT10-[Aβ(21-37)] ₂ -NH ₂) előállítása, tisztítása, analízise.....	41
5.1.3 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly] ₄ -NH ₂ (Ac-OT20-[Aβ(30-37)] ₄ -NH ₂) előállítása, tisztítása, analízise	42
5.1.4 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly] ₄ -NH ₂ (Ac-OT20-[Aβ(21-37)] ₄ -NH ₂) előállítása, tisztítása, analízise.....	44
5.2 Biológiai vizsgálatok: a szintetizált biokonjugátumok antigén tulajdonságainak vizsgálata ELISA módszerrel.....	46
6 Összefoglalás.....	47
7 Irodalomjegyzék.....	48

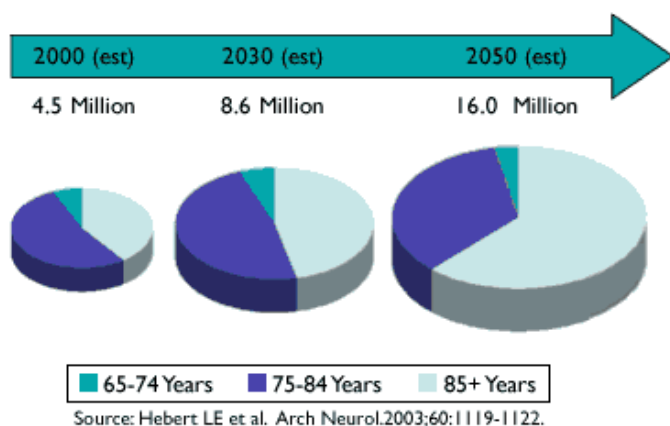
8	Ábrajegyzék	51
9	Rövidítésjegyzék	52
10	Függelék	53

1 Bevezetés

A demencia (szellemi leépülés) lehet tünet és betegség, amit az agy károsodása okoz. A demencia folyamatos leépülést okozó kóros agyi tünetcsoport, amely vezető tünete a memóriazavar, valamint a viselkedési és a személyiségzavarok.

A memóriazavar magába foglalja az újabb ismeretek tanulásának nehézségét, az epizodikus memória (saját személyre vonatkozó adatok: születési hely és idő, korábbi foglalkozás stb.), a rövid távú emlékezés és az ismeretek használatának zavarát. A demens beteg gyakran nehezen tudja elvégezni a mindennapi, általában gondolkodás nélkül ellátott feladatokat, például nem tudja, hogy milyen sorrendben kell felvennie a ruháit, vagy hogy hogyan kell elkészítenie egy ételt. Szokatlanul érzelmessé válhat, vagy hirtelen hangulatváltozásai lehetnek minden ok nélkül. Gyanakvó, ingerlékeny, depressziós, szorongó és izgatott lehet főleg olyan helyzetekben, amikor a memóriazavar is nehezíti a helyzetet. A figyelme hanyatló, gondot okozhat neki egy beszélgetés követése, téveszmék és hallucinációk alakulhatnak ki.

A betegség lefolyása legtöbbször progresszív, a tünetek fokozatosan súlyosbodnak. Az állapotromlás gyorsasága egyénenként változó. A betegek - az első tünetektől számítva - átlagosan 8 évig élnek.



1. ábra Alzheimer-kóros betegek becsült száma a következő évtizedekben az Egyesült Államokban

A demencia 65 év felett a lakosság 5%-át, 80 év felett pedig 20%-át érinti. Az átlagéletkorral együtt emelkedik a demens betegek száma; 2020-ban a világon kb. 37 millió, Európában kb. 6 millió demens beteg várható. Az Alzheimer-kór okozza az összes demenciák 2/3-át; ezt követi az érrendszeret érintő demencia és a Lewy-testes demencia.^{1,2}

A demencia első jelei hosszú tünetmentes szakasz után alakulnak ki. Az Alzheimer-kór időskori formájának a kutatók a 65 év fölött előforduló megbetegedéseket nevezik - a világszerte diagnosztizált esetek 90 százaléka e csoportba tartozik - a kór egy másik, jóval ritkább válfaja a 35-65 év közötti népességet érinti. A korábban induló Alzheimer-kór

súlyosabb tünetekkel jár, mint az idősebbkori, a kórlefordást azonban az életkor alapvetően nem határozza meg. A betegség végső szakaszában a betegek járásképtelenek, egyedül nem táplálkoznak, a vizelet- és székletürítést szabályozni nem tudják.

A leletek azt bizonyítják, hogy a jellegzetes szövettani eltérések 3-4 évtizeddel megelőzik a klinikai tüneteket, tehát az Alzheimer-kór az érintettek esetében már a negyvenes-ötvenes éveikben elkezdődik.

Az idősek Alzheimer-kór tüneteitől mentes populációjában mindazok az idegrendszeri elváltozások kialakulnak, melyeket az Alzheimer-kórra jellemzőnek tartanak. A két populációt az különíti el, hogy a „normálisan” öregedő egyéneknél ezek az elváltozások nem kifejezettek, kisebb területeket érintenek, szemben az Alzheimer-kóros betegekkel, akiknél az elváltozásokat nagy számban/sűrűségben találjuk, az érintett területek jelentős kiterjedésűek, a folyamat progresszív.

A betegség biztos diagnózisát egyelőre csak *post mortem* kórszövettani vizsgálattal vagy biopsziával lehet felállítani.

2 Irodalmi áttekintés

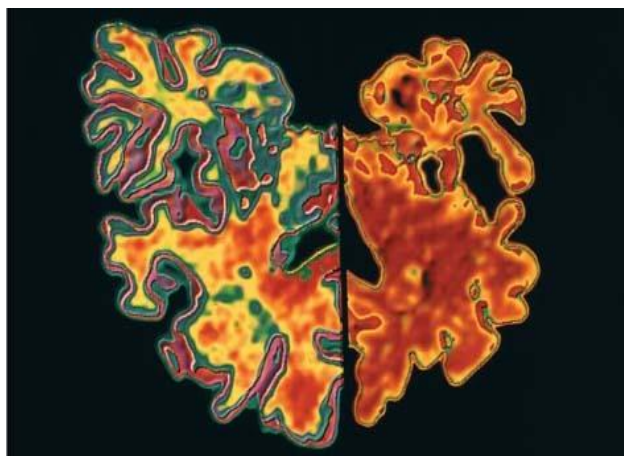
Az Alzheimer-kór a központi idegrendszerben jellegzetes klinikai és patológiai elváltozásokat mutató, az idegsejtek pusztulásával járó betegség.

A kórkép klinikai és patológiai jellemzőit elsőként 1906-ban Alois Alzheimer ismertette. 1901. november 26-án találkozott először Alzheimer doktor azzal a páciensével, aki világhíressé tette nevét az orvostudományban, Auguste Deter nevű betegén diagnosztizálta először az elváltozást. A nő férje azzal kereste fel az orvost, hogy egy éve feleségével súlyos bajok vannak: egyre furcsább dolgokat csinál, mindent elfelejt, és már a háztartást sem tudja ellátni. Alzheimer a továbbiakban azt is megállapította, hogy az asszony sem térben, sem pedig időben nem tud tájékozódni, alig emlékszik valamire az életéből, és gyakran összefüggéstelenül beszél. Mindez pedig azért volt megdöbbentő, mert a nő csak 51 éves volt és korábban szellemileg teljesen ép. Alzheimer az ő esetén keresztül írta le a „felejtés betegségét“.

Az 1911-ben megjelent pszichiátriai tankönyvek az új betegséget már Alzheimer-kórként emlegették.³

A betegség létrejöttének pontos oka még ma sem ismert, de több tényező szerepét feltételezhetjük: genetikai adottság, vírus, környezeti ártalom. A különböző Alzheimer-kór-típusok kialakulásáért felelős géneket már azonosították.

2.1 Szöveti elváltozások



2. ábra Egy egészséges és egy Alzheimer-kóros agy összehasonlítása

Az Alzheimer-kórra jellemző biokémiai/ neurokémiai jellegzetességek közül fontosnak tűnik, hogy az agykéregben csökken az acetil-kolin mennyisége. Makroszkóposan az agytekervények zsugorodottak, a barázdák tágultak, a barázdátság mértéke csökken. (2. ábra)

Az ideg- és a gliasejtek citoplazmájában és magjában specifikus fehérje-

aggregátumokból álló zárványtestek alakulnak ki. Ez egy kóros proteázrezisztens fehérje aggregációja, amelyben az aminosavak sorrendje ugyanolyan, mint a normális fehérjének, csak a térszerkezete változik: α -helikális szerkezetből β -redőssé alakul.

Ezáltal rezisztenssé válik az enzimekkel szemben, nem tud bekerülni a lebontó folyamatba, és felhalmozódik.

Az Alzheimer-kórra szövettanilag két fő elváltozás jellemző: az intracelluláris neurofibrilláris köteg és a szenilis vagy neurit plakk.

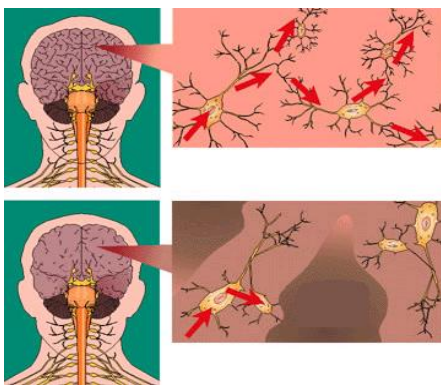
2.1.1 Neurofibrilláris kötegek

A tau-proteinek a mikrotubuláris rendszert stabilizáló fehérjék, dominálónan axonális összetevők. Az idegsejtekben neurofibrilláris kötegeket, a gliában gliafibrilláris kötegeket alkotnak. Az Alzheimer-kór idegsejt- és gliazárványaiban az egészséges emberben található mind a hat tauvariáns kimutatható.

A demencia súlyossága a neurofibrilláris kötegek sűrűségével és eloszlásával arányos. Jelenleg a legérzékenyebb módszer az neurofibrilláris kötegek kimutatására a foszforilált tau-protein-ellenes antitestek használata, mert ezek már akkor jelzik a kötegek helyét, amikor azok még csak kialakulóban vannak. Ha foszfatázrezisztencia alakul ki, akkor az a foszforiláltság kóros természetét bizonyítja.

A neurofibrilláris kötegek az agy régióiban meghatározott sorrendben alakulnak ki. Valószínű, hogy az ezeket tartalmazó idegsejtek hosszú ideig nem veszítik el funkciójukat, sőt az idegnyúlványok regenerációjára utaló új dendrithajtások is megjelennek.

2.1.2 Neurit plakkok



3. ábra Alzheimer-kór esetén az agyszövet egy része elsorvad, így gátolt a szinapszis a neuronok között. A neuronkiesés okozza a betegség tüneteit.

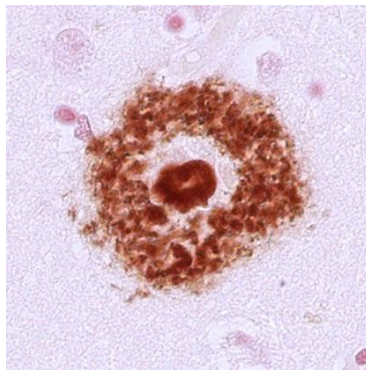
A neurit plakk β -amiloid peptidből és az azt körülvevő degenerált idegnyúlványokból áll. (3. ábra) A neuronok nyúlványai torzulnak, ennek eredményeként disztrófiás neuritek és ún. neuropilfonatok jelennek meg. Ha egy plakk környezetében nagyszámú disztrófiás neurit található, akkor neuritikus plakkról beszélünk. A neuritikus plakkokban általában kimutatható a tau-protein.

A betegek agyában kialakuló infarktusok és vérzések háttérben gyakorta az amiloidlerakódások állnak.

Kórélettanilag az agy részeiben, a halánték- és a homloklebenyben, valamint a hippocampusban a sorvadást, az idegsejtdegenerációt és az amiloid felszaporodását igazolták.

Az Alzheimer-kórban szenvedők agyában jellegzetes gliaelváltozásokat is találtak. Reaktív asztrociták jelennek meg a neuritikus plakkokban és környezetükben, vagy ott, ahol neuronkiesés van. A kéreg neuronkieséseit szinaptikus kapcsolatok elvesztése okozza.^{1,4}

Önmagukban sem a tau-protein, sem a plakkok (4. ábra), sem a neurofibrilláris kötegek nem specifikusak az Alzheimer-kórra.



4. ábra Amiloid plakk

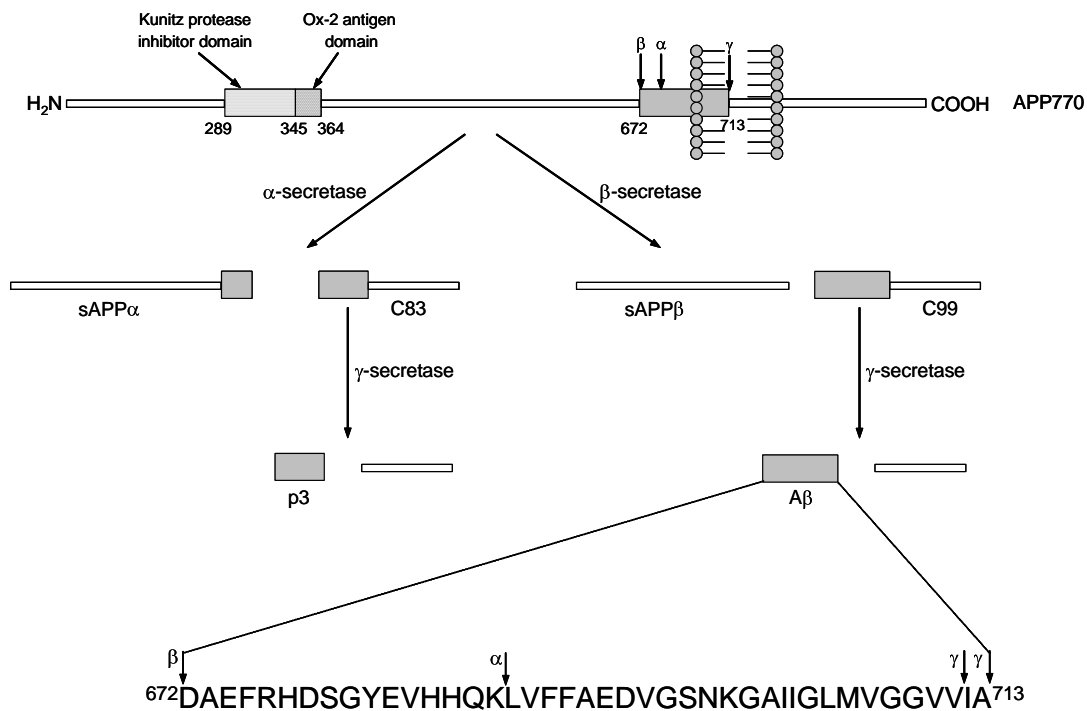
2.2 Amiloid prekursor protein

Az amiloidról feltételezik, hogy neurotoxikus hatása van, ez indíthatja el a plakk-képződést. A β -amiloid peptid, az amiloid prekursor protein (APP) lebomlási terméke⁵, egy a szervezetben megtalálható, természetes neuronális membránfehérje, amely 38-42 aminosavból áll. Ez a fehérje az agyi erek falában is lerakódhat, aggregálódhat.

A β APP egy transzmembrán glikoprotein, mely egy transzmembrán régióból, egy nagy extracelluláris doménből és egy kisebb C-terminális, intracelluláris részből áll. Megtalálható a szívben, a vesékben, a tüdőben, a lépben, a belekben és az agyban is.^{6,7}

A metabolizmus során az α -szekretáz enzim lehasítja az APP-t a transzmembrán régióról (⁶⁸⁵HQK \uparrow LVF⁶⁹⁰). Ekkor nem keletkeznek plakkok, mert az enzim hasítási helye az amiloid szekvenciáján belül található, a folyamat során APP α képződik, ami neuronvédő hatást fejt ki. Az élő szervezetben léteznek alternatív metabolikus utak is. A β -szekretáz az APP-ből oldható APP β -t hasít le (\uparrow ⁶⁷²DAEF⁶⁷⁵), majd a kisebb C-terminális domén további hasításával

(γ -szekretáz, $^{707}\text{VGGVV}\uparrow\text{IA}^{713}\uparrow$) 40-42 aminosavat tartalmazó β -amiloid ($\text{A}\beta$) keletkezik (5. ábra).⁸



5. ábra Az APP enzimatis hasadásának lehetséges útvonalai

Normális körülmények között a leggyakoribb formája az amiloidnak az $\text{A}\beta_{40}$, mégis a lerakódások nagyrészt a hosszabb, fibrillumokat könnyebben alkotó $\text{A}\beta_{42}$ -ből állnak.

A szervezet által kiválasztott amiloid 90-95%-a $\text{A}\beta_{40}$ (a gerincvelőben szinte csak ez található), és kevesebb, mint 10%-a $\text{A}\beta_{42}$.⁹ Korábban feltételezték, hogy az $\text{A}\beta_{42}$ csak a betegség kialakulása során választódik ki, de a kutatások során kimutatták, hogy keletkezhet a sejt normális működése során is. A plakkokban az erősebb fibrillogén tulajdonsága miatt túlnyomórészt $\text{A}\beta_{42}$ található, mert könnyebben és gyorsabban alkot oldhatatlan aggregátumokat, mint az $\text{A}\beta_{40}$.^{10,11}

2.2.1 Amiloid kaszkád

Három gén, az APP, a prenesilin1 és a prenesilin2 az Alzheimer-kór különböző formáit okozhatják. *In vitro* és *in vivo* kísérletek igazolták, hogy ezek mutációi növelik a sejtek $\text{A}\beta_{42}$ termelését, és annak későbbi aggregálódását.¹² Az $\text{A}\beta_{42}$ szintjének emelkedése a vérplazmában már jóval a klinikai tünetek megjelenése előtt észlelhető, tehát az intenzív kiválasztás nem a betegség kialakulása után lép fel.¹³

Az oligomerizálódó fehérje lerakódik, diffúz plakkokat alkot. Ezek az aggregátumok kismértékben gátolják a szinapszisok működését, de ez a hatásuk a kór előrehaladtával egyre nagyobb mértékűvé válik. Az idegsejtek így már kevésbé tudnak alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez, megváltozik az ionháztartás, illetve egyes kinázok és foszfatázok aktivitása. Ennek következményeként az agy nagy területén idegi rendellenességek alakulnak ki. A sejtek egy része elhal, nem keletkezik elegendő neurotranszmitter, így kialakul a demencia.

Az Alzheimer-kóros betegek agyában gyulladási folyamatok zajlanak le. A gyulladás a szervezet válasza sérülésre vagy fertőzésre, a természetes gyógyulási folyamat része. A kutatók szerint a gyulladás hamarabb jelen van, mint ahogy a plakkok teljesen kifejlődnének, mégsem biztosak abban, hogy hogyan befolyásolja a gyulladás a betegség előrehaladását. A gyulladásnak károsító hatása lehet az idegsejtekre, ugyanakkor az általa kiváltott immunfolyamatok hatására a plakkok egy része lebomlik.¹⁴

2.3 Immunterápia

Feltételezik, hogy a β -amiloid plakkok felelősek az Alzheimer-kór kialakulásáért, ezért a β -amiloid egy fontos molekuláris célpont lehet a betegség kezelésében.⁶ Azokat az anyagokat, melyek megelőzik a kialakulását és aggregálódását, illetve segítik a lerakódások elbontását, a kezelés során alkalmazni lehetne. Ilyen lehet például az APP metabolizmusát megváltoztató, az α -szekretáz működését serkentő vagy a β - és γ -szekretázokat gátló hatóanyag. Egy másik lehetőség az amiloid aggregáció gátlása szintetikus peptidokkal (β -blokkolókkal), glükózaminoglikánokkal vagy β -amiloid ellenes antitestekkel. Egyéb stratégiák a neurotoxikus hatás megszüntetésére fektetik a hangsúlyt, a kalcium, cink és réz egyensúly fenntartásával, a koleszterinszint változtatásával és antioxidáns terápiával.^{15,16}

A plakkok lebomlását és az agyból való kiürülésének mechanizmusát már részleteiben vizsgálták, mégsem sikerült a pontos lefolyást megállapítani. A legvalószínűbb mechanizmus, hogy az amiloid-monomer, -oligomer és -plakk között fennálló dinamikus egyensúly az agygerincvelői folyadék, az agy és a plazma között megváltozik. Az egyik speciesz koncentrációváltozása felborítja az egyensúlyt, így az eltolódik az egyik forma képződésének irányába. A koncentrációk addig változnak, amíg egy új egyensúly be nem áll.^{17,18}

A β -amiloid szint csökkentésének egyik módja a specifikus antitestekkel való kezelés. Ezek segítik a fehérje kiürülését, gátolják a plakkok lerakódását, a glia-elváltozásokat. Az előrehaladott betegség esetén csökkenthetik a tünetek súlyosságát. Az állatkísérletek során (egerek, patkányok, majmok) az aktív immunizálás csökkentette a kialakuló demencia mértékét, és anti- β -amiloid peptid antitestek passzív beadásával is csökkenthető volt az amiloid mennyisége az agyban.^{18,19} Emberek esetében a β -amiloiddal való közvetlen immunizálás nem lehetséges a fehérje toxicitása miatt (okozhat agyhártya- és agyvelőgyulladást). Az A β 42 lerakódhat a meglévő plakkokra, segítve azok növekedését, ezáltal pont a céllal ellentétes hatást fejtene ki.¹¹

Megelőző vakcinákat, melyeket fertőző betegségek elkerülésére adnak, olyan krónikus betegségek (rák, szív- és érrendszeri rendellenességek) kezelésére is használnak, amelyek kezelésére kevés terápia létezik és azok hatékonysága csak kicsi. A hagyományos oltóanyagok, melyek elpusztított vagy legyengített kórokozót tartalmaznak, a fertőző betegségeket okozó mikrobák ellen harcolnak. Ezek humánterápiás használata azonban korlátozott: előállításuk, tárolásuk bonyolult és kockázatos, különböző szennyezőket tartalmazhatnak, illetve nem megfelelően legyengített kórokozók esetén nem kívánatos mellékhatások jelentkezhetnek. A természetes oltóanyagok hátrányainak kiküszöbölésére szintetikus, peptidalapú oltóanyagokat fejlesztettek ki, melyek szelektívek és biztonságosak, ezen kívül nagy mennyiségben és tisztán előállíthatók.

A mesterséges vagy szintetikus vakcinák rövid oligopeptid szakaszt tartalmaznak az adott epitópot tartalmazó proteinből, melyek védekező immunválaszt váltanak ki a szervezetben. Ennek segítségével más epitópok kifejeződését, melyek az immunrendszert nem kívánatos módon stimulálnák, el lehet kerülni. Általában ezek a rövidebb peptid szakaszok önmagukban nem képesek a megfelelő ellenanyagválasz kiváltására, ezért nagyobb hordozó molekulákhoz kapcsolják azokat.

Az Alzheimer-kór elleni oltóanyag kutatásban a legfontosabb cél a β -amiloid epitópjának meghatározása volt, aktív antitestekkel való vizsgálatok segítségével. Az antitestek által felismert epitópok azonosításával oligomer specifikus biokonjugátumok állíthatók elő immunterápiás használatra.²⁰

Proteolitikus hasítás után tömegspektrométerrel vizsgálták az A β -antigén-antitest immunkomplexet. Ezen kísérlet alapján a „plakk-specifikus” A β -antitestek (melyek az aktív immunizálás során keletkeznek) és a „plakk-védő” A β -autoantitestek (melyek megtalálhatók a

humán szérumban és megakadályozzák az A β -fibrillumok kialakulását) epitóp fajlagossága eltérő.

A β -amiloid plakk-specifikus epitópjának az *N*-terminális A β (4-10) (⁴FRHDSGY¹⁰), míg az A β -autoantitestek által felismert szekvenciának a *C*-terminális A β (21-37) (²¹AEDVGSNKGAIIGLMVG³⁷) adódott.²¹ Az autoantitestek A β (21-37) szekvenciával való kölcsönhatása megakadályozhatja az amiloid-aggregátumok kialakulását.

Kimutatták, hogy az A β -autoantitestek speciálisan csak az oligomer állapotban (pl. aggregálódott formában) ismerik fel az A β (21-37)-et. Továbbá megállapították, hogy ha az epitópot egy oligopeptid hordozóhoz kapcsolják, akkor a több A β (21-37) epitópot tartalmazó konjugátumok nagy affinitással kötődnek az autoantitestekhez, míg ha a hordozóhoz csak egy epitóp kapcsolódik, akkor azt az autoantitest nem ismeri fel (Manea és mtsai., nem közölt adat). Ilyen konjugátumokban hordozóként felhasználhatók egyes oligotuftsín peptidszármazékok.

A tuftsín (TKPR) immunrendszerre gyakorolt hatásai kiterjedtek, így jó alternatíva lehet szintetikus oltóanyagok előállítására. Kutatások kimutatták, hogy polituftsín-konjugátumok megtartják a tuftsín kedvező tulajdonságait, és megnövelik az epitóp specifikus antitestek termelődését. Az alkalmazott szekvencia egy kutyából származó tuftsín analóg négyszer ismétlődő peptidszakasza, a (TKPKG)₄. Ez az összetételű oligopeptid nem toxikus, nem vált ki immunválaszt a szervezetben, de megőrzi a tuftsín-szerű tulajdonságokat, így például az immunstimuláló hatást. Előnye még hidrofil tulajdonsága, ezáltal a belőle készített konjugátumok általában szintén igen vízoldhatók.²²

A biokonjugátumok előállíthatók lépésenkénti szintézissel, ekkor az epitópot a hordozó egy vagy több arra alkalmas oldalláncán építik fel, közöttük tehát amidkötés található. A konjugátum létrehozható olyan kemoszelektív ligációval is, mely a β -amiloid epitóp és a hordozó között fiziológiás körülmények között is stabil kötést eredményez. Ilyen például a tioéter-kötés, melyet egy klóracetil-csoport és egy az epitóphoz kapcsolt cisztein tioleszter között alakítanak ki. A cisztein oldallánca könnyen oxidálódik, ezáltal diszulfidhídon keresztül dimerek is keletkezhetnek. Ez a reakció a konjugáció versenytársa, ezért az oxidációt vissza kell szorítani.

Az epitóp-specifikus biokonjugátumok szintetikus oltóanyagként, az Alzheimer-kór elleni immunterápiában, illetve immundiagnosztikában használhatók. Segítségükkel vizsgálható a β -amiloid ellenes autoellenanyag koncentrációja különböző életkorban, illetve beteg és nem beteg emberek szervezetében. Jelenleg a vizsgálatok összefüggést keresnek az A β -

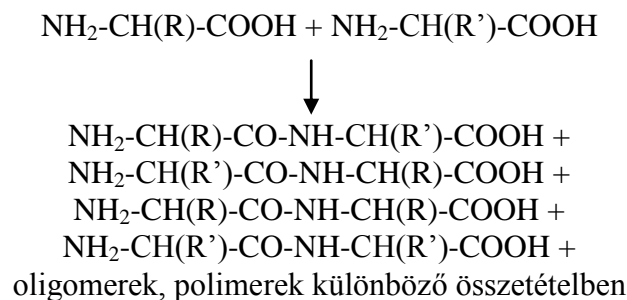
autoellenanyag koncentrációja és a betegség között. Amennyibe találnak ilyen összefüggést, akkor a betegség már korábbi stádiumban, a tünetek megjelenése előtt detektálhatóvá válna. A kifejlődött plakkokat pedig a konjugátumok által kiváltott ellenanyagválasz segítségével el lehetne bontani.

2.4 Peptidszintézis

Peptidek előállításának két fő lehetséges módja az oldatban végzett szintézis, melyet napjainkban egyre ritkábban használnak, illetve a szilárdfázisú peptidszintézis.

A hagyományos peptidszintézis homogén oldatban zajlik. Minden lépés után izolálni kell a terméket, amely kicsapatható az oldatból. Ez a lépés általában 60-90%-os kitermeléssel jár, azaz az anyag egy része elveszik. Amennyiben a szintézis során sok aminosavat kell összekapcsolni, előfordulhat, hogy az egymást követő reakciók során elfogy az anyag. Ahhoz, hogy egyszerűbben, gyorsabban és hatékonyabban lehessen peptideket előállítani, Merrifield kidolgozta a szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS) elméletét. A peptid felépítése, az oldatban végzett szintézishez hasonlóan, történhet aminosavanként (stepwise), vagy a konvergens szintézis módszerével, amikor is hosszabb, védett, vagy részlegesen védett peptidláncokat kapcsolnak össze fragmenskondenzációval a szilárd hordozón.

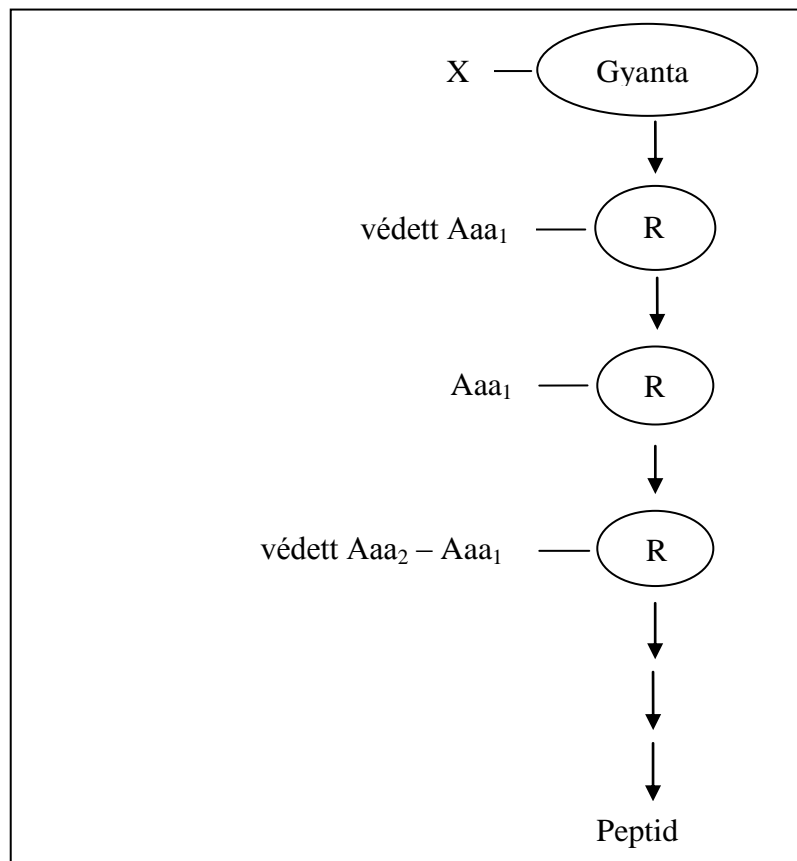
Ha két aminosavat akarunk összekapcsolni, akkor vízkilépés mellett többféle terméket is kapunk:



Ennek elkerülésére az egyik aminosav aminocsoportját, míg a másik aminosav karboxilcsoportját védeni kell. Szilárdfázisú peptidszintézis során a C-terminális védelmét a gyanta látja el. Az SPPS során a nagy reagens felesleg miatt az átmeneti amino-védőcsoport mellett az oldallánc funkciós csoportokat állandó védőcsoporttal kell védeni.

Az SPPS technika esetén a peptid egy szilárd, oldhatatlan hordozóhoz van kapcsolva, amíg el nem készül a megfelelő hosszúságú peptidlánc. Merrifield úgy gondolta, hogy az alkalmas hordozó egy stabil, oldhatatlan polimer lehet, amin funkciós csoportok találhatóak. A funkciós

csoporton keresztül kapcsolható a peptid C-terminális felőli első aminosava a gyantához, majd az átmeneti amino-védőcsoport hasítását követően, a következő – megfelelő módon védett, és aktivált – aminosav-származék peptidkötéssel kapcsolható. E néhány lépés ismétlésével előállítható a teljes peptidlánc. A kész peptidlánccról el kell távolítani a védőcsoportokat, amit többnyire egy lépésben végeznek a peptid gyantáról való hasításával. Ezáltal a megfelelő tisztítási lépések után megkapjuk a kívánt peptidet (6. ábra).²³



6. ábra A szilárdfázisú peptidszintézis elve

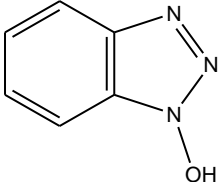
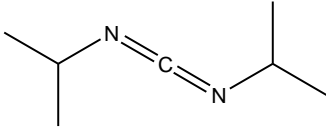
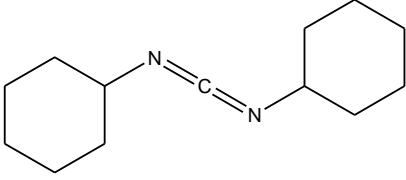
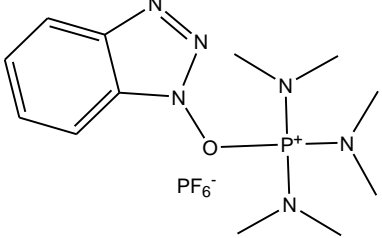
Az eljárás előnye, hogy a reakcióelegy minden lépés után szűrhető, így az elreagálatlan anyagok és a melléktermékek eltávolíthatók, a szilárd gyanta és a hozzá kovalens kötéssel kapcsolt növekvő peptidlánc pedig a szűrőn marad. Ezáltal az egész szintézis egyetlen reakcióedényben – például egy fecskendőben – végezhető, és a veszteségek is csökkennek. Az SPPS nem csak leegyszerűsíti, hanem lényegesen gyorsítja is a szintézist.

A módszer hátránya, hogy bár a felesleges reagensek könnyen eltávolíthatóak, a peptid izolálása és vizsgálata csak a gyantáról való hasítás után lehetséges. A hibás szekvenciák elkerülése érdekében a kapcsolási reakcióknak közel 100%-os konverziójúnak kell lenniük. Ez a reagensek és kapcsolószerek a gyantakapacitáshoz viszonyított 3-5 ekvivalensnyi

menyiségének használatával valósítható meg, azonban a nagy felesleg elkerülhetetlenné teszi az oldallánc-funkciós csoportok védelmét.

Az aminosavak kapcsolásához kapcsoló reagenseket (I. táblázat) használnak, melyek aktiválják az aminosav karboxilcsoportját, elősegítve ezzel a peptidkötés létrejöttét.

1. táblázat A peptidszintézis során használt kapcsolószerek

Kapcsolószér	Rövidítés	Képlet
1-hidroxi-benzotriazol	HOBt	
<i>N,N'</i> -diizopropil-karbodiimid	DIC	
<i>N,N'</i> -diciklohexil-karbodiimid	DCC	
benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)-foszfónium hexafluoro-foszfát	BOP	

A reakcióelegyben így aktív észter keletkezik, ami *in situ* elreagál az épülő peptidlánc szabad aminocsoportjával.^{24,25}

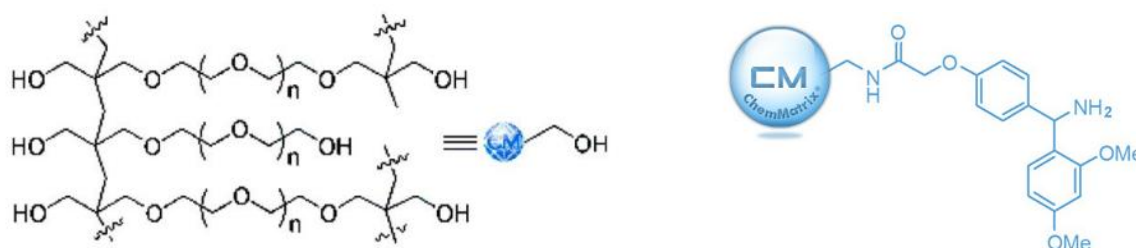
2.4.1 A gyanta

A gyanta felületén funkciós csoportok találhatóak, amikhez hozzákapcsolható az első aminosav karboxilcsoportja. A jó hordozó kémiaailag inert és mechanikailag stabil, az alkalmazott oldószerekben jól duzzad, hogy az épülő peptidlánc a reagensek számára hozzáférhető legyen. A peptid - gyanta kötésnek a szintézis során stabilnak kell lennie, de a kész peptidláncot könnyen le kell tudni hasítani a gyantáról.

Merrifield a módszer fejlesztése során több polimer hordozót alkalmazott (cellulóz, polivinil-alkohol, ioncserélő gyanták). A vizsgáltak közül a legjobbnak a klór-metilezett sztírol - 1,4-divinilbenzol (1-2%) kopolimer bizonyult. Ez a keresztkötéses gyanta porózus szerkezetű, így lehetővé teszi a reagensek átjutását speciális, duzzadást előidéző oldószer jelenlétében.²³

Napjainkban már többféle gyanta is forgalomban van, melyek különböző funkció csoportokkal vagy funkcionizált linkerekkel vannak ellátva. A szintézishez mindig a választott módszerrel kompatibilis, megfelelő C-terminális véget (karboxil vagy amid) eredményező gyantát választják.

Biokonjugátumok totálszintézisére a legalkalmasabb egy kis kapacitású, jól duzzadó gyanta. Ilyen gyanták a polietilén-glikol alapú gyanták, mint pl. a ChemMatrix[®] gyanta. Ez a gyanta csak polietilén-glikol monomert tartalmaz, így kizárólagosan primer éterkötéseket tartalmaz (7. ábra). Emiatt mind mechanikailag, mind kémiaailag nagyon stabil. 50%-kal jobban duzzad diklórmetánban és *N,N*-dimetilformamidban, illetve ötször jobban vízben, mint a polisztirol alapú gyanták; továbbá rendkívül jól duzzad trifluoecetsavban is. A ChemMatrix[®] ezen tulajdonságai miatt alkalmas az Fmoc/^tBu stratégiával való peptidszintézisre.^{26,27,28}



7. ábra Rink Amide ChemMatrix[®] gyanta

2.5 A szilárdfázisú peptidszintézis stratégiái

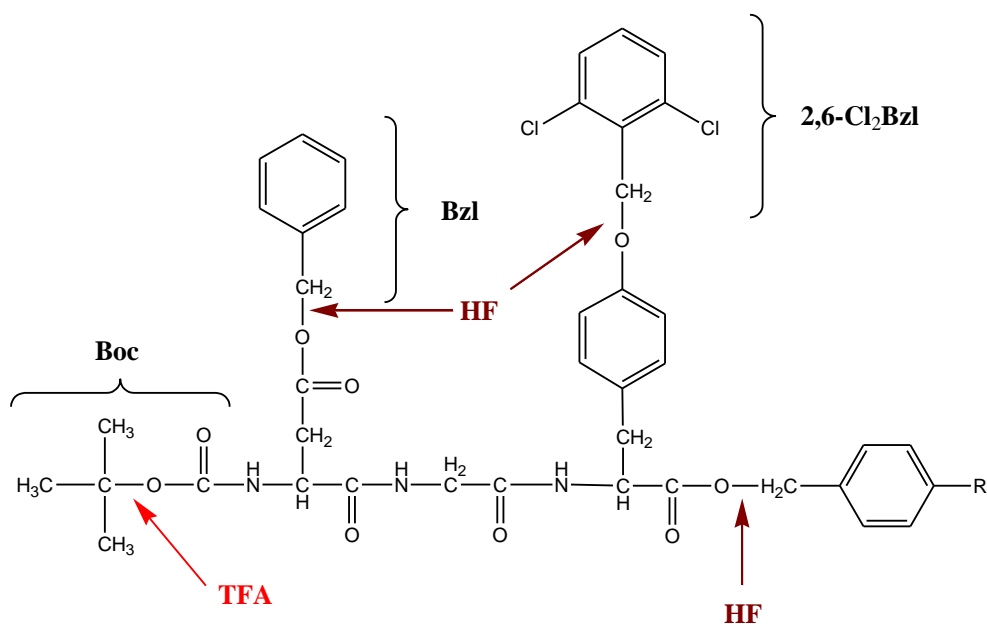
A szilárdfázisú peptidszintézisnek két általánosan használt stratégiáját különíthetjük el:

- Boc/Bzl stratégia: az aminosav származékok α -aminocsoportját *tert*-butiloxikarbonil-csoporttal védik²⁹
- Fmoc/^tBu stratégia: az α -aminocsoport védelmét 9-fluorenil-metiloxikarbonil-csoport látja el³⁰

Az alkalmazott stratégiát a szintetizálandó peptid szekvenciája határozza meg, de természetesen a rendelkezésre álló eszközök (pl. HF készülék) megléte vagy hiánya is befolyásolhatja.

Boc/Bzl stratégia (8. ábra)

A módszer során az α -aminocsoportot *tert*-butiloxikarbonil-csoporttal, míg az oldallánc funkciós csoportokat többnyire benzil-típusú csoportokkal védjük. Az átmeneti védőcsoport lúgokkal és nukleofilokkal szemben stabil, de híg savakkal eltávolítható. A lehasadása 30-50% TFA/DCM eleggyel 20-30 perc alatt megy végbe. Ekkor reaktív *tert*-butil kation keletkezik, amely alkilezheti az érzékeny aminosavakat (triptofán, metionin, cisztein). A reaktív karbokation koncentráció minimalizálása érdekében a hasítást két – egy rövidebb és egy hosszabb időtartamú – lépésben szokták végezni, és amennyiben szükséges, gyökfogót (kationfogót) alkalmaznak a mellékreakciók elkerülésére.



Boc-Asp(OBzl)-Gly-Tyr(2,6-Cl₂Bzl)-Merrifield gyanta

8. ábra Boc/Bzl stratégia

A Boc-csoport eltávolítása után az α -aminocsoport trifluoracetát sója keletkezik, aminek a semlegesítéséhez 5-10%-os DIEA/DCM oldatot használnak. Az aminosavak kapcsolásához aktív észtert hoznak létre, amihez DCC és HOBT kapcsoló reagenseket használnak.

Az alkalmazott gyanta függ a szintetizálandó peptidtől. A Merrifield (klórmetil) és a PAM (fenil-acetamidometil) gyanták a hasítás után a C-terminálison szabad karboxil, míg a BHA (benzhidrilamin) és MBHA (4-metil-benzhidrilamin) gyanták amid véget eredményeznek.

Mivel a peptid – gyanta kötésnek a szintézis során végig stabilnak kell lennie, ezért olyan kötést kell kialakítani az első aminosav és a gyanta között, amely nem hasad TFA hatására. A végső hasításnál erős savakat használnak (HF, TMSOTf, TFMSA), amely során az oldallánc

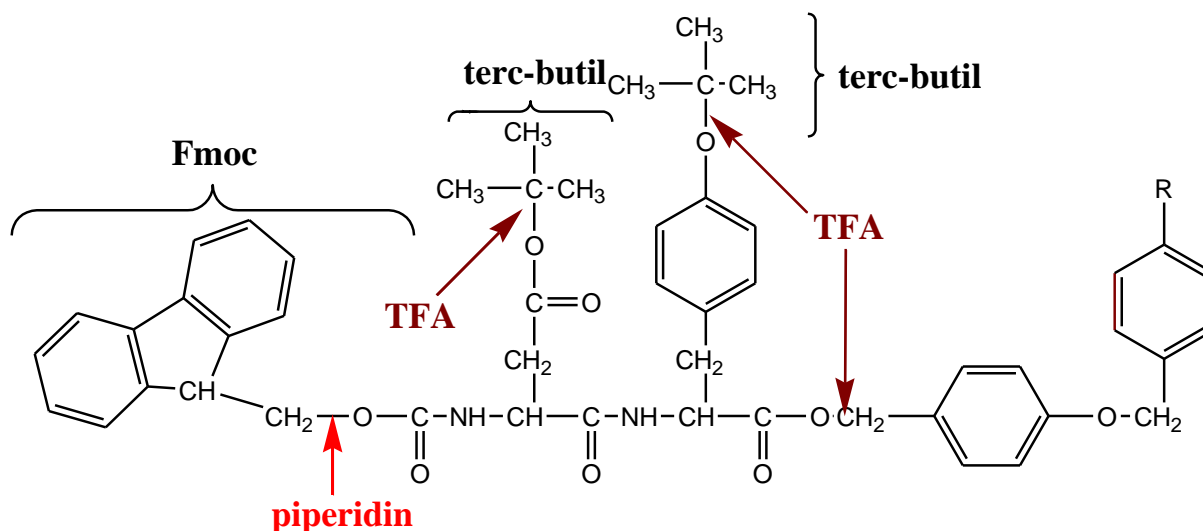
védőcsoportok is lehasadnak. A savra érzékeny aminosavak (Trp, Met, Cys, Tyr) esetén a hasításhoz megfelelő gyökfogókat és redukáló szereket kell alkalmazni.³¹

Ezzel a stratégiával előállíthatók elágazó láncú peptidek, illetve alkalmas könnyen aggregálódó peptidek szintézisére is, mert a trifluor-ecetsavas hasítás során az aggregátumok szétesnek.

Fmoc/^tBu stratégia (9. ábra)

Az Fmoc/^tBu módszer esetén a savakra érzékeny aminosavak (Trp, Met, Cys, Tyr) oxidációja és alkileződése elkerülhető a peptidlánc felépítése során, így az ilyen aminosavakat tartalmazó szekvenciák szintézisére ez a módszer előnyösebb, mint a Boc/Bzl stratégia.

Az aminosav-származékok α -aminocsoportját 9-fluorenil-metiloxikarbonil-csoporttal, az oldalláncok funkciós csoportjait pedig *tert*-butil-típusú védőcsoportokkal látják el. Az α -aminocsoportot védő Fmoc-csoport savakkal szemben stabil, de bázisokra érzékeny. Hasítása 20-55%-os piperidin – DMF oldattal történhet, ekkor dibenzofulvén keletkezik. Ez az átmeneti termék igen reaktív, bizonyos aminosavakat képes alkilezni, de a piperidinnel stabil adduktot képez, így elkerülhetők a mellékreakciók.



Fmoc-Asp(O^tBu)-Tyr(^tBu)Wang gyanta

9. ábra Fmoc/^tBu stratégia

Kísérletek igazolták, hogy 2% piperidint – 2% 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undek-7-ént (DBU) tartalmazó DMF oldat gyorsan és hatékonyan lehasítja az átmeneti védőcsoportot. Ezzel a módszerrel térbeli gátlás esetén is sikerül a hasítás, illetve csökkenti az enantiomerizáció valószínűségét.^{32, 33}

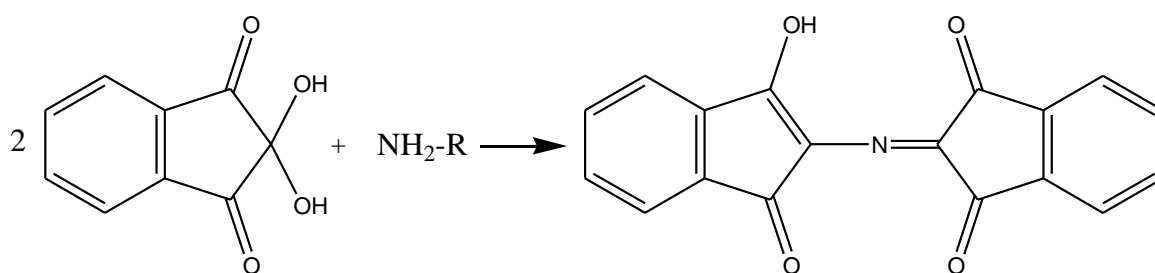
Az aminosav-származékok kapcsolásához a Boc/Bzl stratégiával ellentétben DIC és HOBt reagenseket használnak. A különbség abból adódik, hogy a keletkező DCU a TFA-val való hasítás során feloldódik és eltávolítható a peptid-gyanta mellől, de a piperidines hasítás során nem. Ezzel szemben a DIC-ből keletkező DIU oldódik az alkalmazott szerves oldószerben, így használható az Fmoc/^tBu módszer esetén. Természetesen a DIC használható a Boc-stratégia esetén is, de sokkal drágább, bár nagy előnye, hogy sokkal kevésbé allergén, mint a DCC.

Az állandó védőcsoportokat a gyantáról való hasítás során távolítják el. A hasítás 80-95%-os TFA oldattal történik, a keletkező reaktív karbokationok miatt gyökfogókat kell használni. (A *tert*-butil kation legjobb semlegesítője a víz.) Az Fmoc-módszerrel megfelelő gyanta (pl. CITrt vagy SASRIN gyanták) esetén, amelyekről a peptidlánc ecetsavval vagy 1-2%-os TFA oldattal hasítható, védett peptidek is előállíthatók a védőcsoportok ortogonalitása miatt.

Ennél a stratégiánál is többféle gyanta (polisztirol-1,4-divinilbenzol (1%) kopolimer alapúak) áll rendelkezésre a szintetizálandó peptidtől függően. A C-terminálison karboxil véget eredményez a Wang, a SASRIN (extrém sav-érzékeny gyanta) és a 2-klórtritol gyanta, míg amid végű peptidekhez alkalmazhatók a Rink Amide típusú gyanták. Ezek polietilénlikolt is tartalmazó változata is ismert, melyek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek: kitűnő nyomásstabilitás, jó duzzadási képesség, még vizes oldatban is. Általában alacsony a gyantakapacitásuk (0,2-0,6 mmol/g), így alkalmasak aggregálódó peptidek szintézisére, fragmenskondenzációra illetve gyantán történő ciklizálásra.

2.5.1 Kapcsolási reakciók követése

A szintézis során követni kell a reakciók sikerességét a hiányos szekvenciák elkerülése érdekében. Az elreagálatlan, szabad aminocsoportokat tartalmazó peptidek reagálnak ninhidrinnel és jellegzetes kék színt adnak. Ez a „Kaiser-teszt” (10. ábra), mely során a gyantaszemekhez ninhidrin-, KCN- és fenol-oldatot adnak, majd 4-5 percen keresztül 104 °C-on tartják. Ha az oldat színe nem változik, vagyis sárga marad, akkor az a szabad aminocsoportok hiányát jelzi, tehát sikerült a kapcsolás. Ha a gyantaszemek kékké válnak, akkor újrapcsolásra van szükség. A teszt nagyon érzékeny, már 1% szabad aminocsoport jelenléte is intenzív kék színt ad.



10. ábra Kaiser-teszt

A prolin egy iminosav, szintén reagál ninhidrinnel, de az oldat színe nem változik még szabad imino-csoport esetén sem, ezért izatint (2,3-indolin-dion) is kell a reakcióelegyhez adni. Ekkor sikertelen kapcsolat esetén a gyantaszemek vöröses - sötétbarnás színűek lesznek.^{34,35}

2.6 ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Az ellenanyag - antigén kölcsönhatás igen erős és szelektív; az így kialakult komplexet másodlagos kötőerők tartják együtt. Az ilyen kölcsönhatáson alapuló immunkémiai módszerek felhasználhatók az antigén vagy antitest kimutatására, mennyiségének meghatározására, és a kölcsönhatás erősségének mérésére. Erre általában enzimes jelzést alkalmaznak.³⁶

Ilyen biokémiai vizsgálat az ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) módszer is, ahol az enzim szubsztrátjának hozzáadása után színreakció vagy fluoreszcencia észlelhető. Segítségével meghatározható a vészérum antitest tartalma (pl. HIV-teszt), gyorsan kimutathatók egyes drogok és gyógyszerek, de az élelmiszeripar is használja allergének kimutatására.

A jelzéshez leggyakrabban peroxidáz enzimeket használnak. A szubsztrát hozzáadása után szabad szemmel is észlelhető színreakció következik be. A peroxidáz enzim H_2O_2 hatására hidrogént von el a színtelen kromofórtól, így annak az oxidáció során átalakul az elektronszerkezete, és a látható tartományban is képes lesz fényelnyelésre.

Az immunkémiai módszerek alkalmazásakor a meg nem kötődött jelzett ellenanyagot vagy antigént el kell választani az antigén-antitest komplextől. Ehhez mikrotitrációs lemezhez adszorbeáltatják a komponenseket, így a feleslegben alkalmazott reagensek mosással eltávolíthatók.

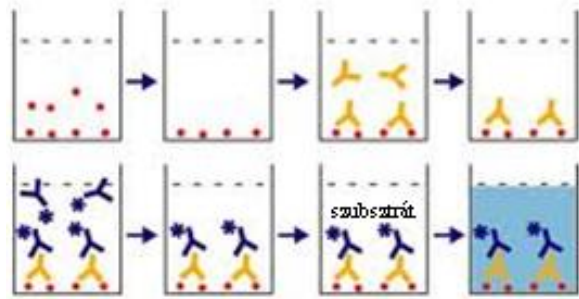
Direkt módszer

A vizsgálat során általában az antigéneket adszorbeáltatják a szilárd felszínhez, majd specifikus, jelzett antitestet adnak hozzá, ami kialakítja az antigén-antitest komplexet. A nem

kötődött ellenanyagot mosással eltávolítják, majd meghatározzák a jel intenzitását, ami arányos a megkötődött ellenanyag mennyiségével.

Indirekt módszer

Ha nem lehet jelzéssel ellátni az ellenanyagokat, akkor az antigéneket a szilárd hordozóhoz kötik, majd hozzáadják az ellenanyagot tartalmazó oldatot. Inkubálás után kimossák a nem kötődött ellenanyagokat. Ezután az első ellenanyag ellen termeltetett jelzett ellenanyagot adnak a mintához, amely



7. ábra Indirekt ELISA

hozzákötődik az első antitesthez. A felesleg kimosása és a szubsztrát hozzáadása után a jelerősség alapján meghatározható az oldat ellenanyagtartalma (11. ábra).

Munkánkban ezt az eljárást alkalmaztuk.

„Szendvics” módszer

Ha az antigén rosszul tapad a lemezhez, akkor az antigén-specifikus ellenanyagot kötik a szilárd felülethez. Ehhez adják hozzá az antigén oldatát, a nem kötődött felesleget pedig kimossák. Ezután jelzett antitestet adnak a rendszerhez, inkubálják, majd a felesleget eltávolítják. A mért jelből meghatározható a kötődött jelzett ellenanyag mennyisége.

Jelzett és jelzetlen antigének versenye

A lemezhez adszorbeált ellenanyaghoz ismert koncentrációjú jelzett és ismeretlen koncentrációjú jelzetlen antigént adnak. Minél nagyobb a jelzetlen antigén koncentrációja, annál inkább kiszorítja a jelzett antigént a komplexből. A mosás után észlelt jel fordítottan arányos a jelzetlen antigén mennyiségével. Ez a módszer felhasználható vérszérum antigéntartalmának meghatározására.

Jelzett és jelzetlen ellenanyagok versenye

Adott mennyiségű jelzett és ismeretlen koncentrációjú jelzetlen ellenanyagot adnak a felszínhez kötött antigénhez. Minél erősebben kötődik a nem jelzett ellenanyag és minél több van belőle, - a felesleg kimosása után - annál kisebb lesz az észlelt jel. A módszer segítségével meghatározható az azonos antigént, de különböző epitópot felismerő antitestek epitópjainak egymáshoz viszonyított helyzete. Ha közel vannak egymáshoz, akkor az

ellenanyagok térben gátolják egymás kötődését; ha távol helyezkednek el, akkor nem befolyásolják egymás kötődését.

Antigének versenye a jelzett ellenanyagért, kiszorítás

Az ismert antigént a szilárd fázishoz kötik, majd a rendszerhez hozzáadják az ismeretlen antigén és a jelzett antitest oldatát. Az ismeretlen antigént nagy koncentrációban alkalmazva megakadályozza az ellenanyag kötődését a „célantigénhez”. Minél erősebb az ismeretlen antigén - ellenanyag kölcsönhatás, annál kisebb koncentrációnál észlelhető a gátlás. Ez felhasználható a kölcsönhatás erősségének a vizsgálatára.

A szintetizált antigének vizsgálatai során a német partner egyetemen (Prof. Michael Przybylski laboratóriuma, Department of Chemistry Laboratory of Analytical Chemistry and Biopolymer Structure Analysis, University of Konstanz) indirekt ELISA módszert alkalmaztak az autoantitestek kötődésének megállapításához.

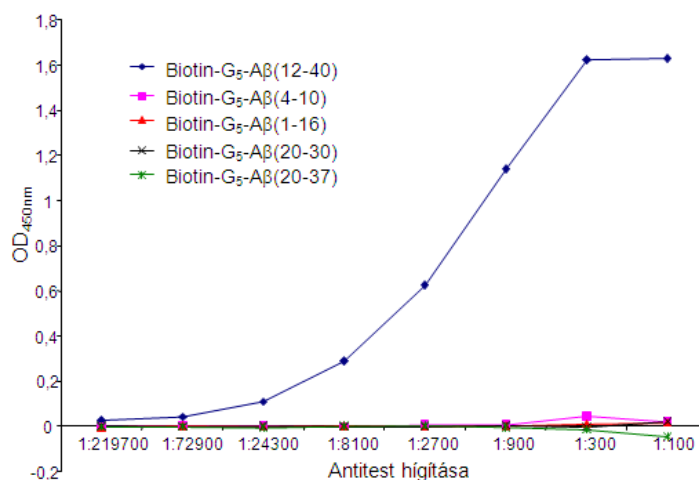
2.7 Kutatási előzmények

A csoportban végzett korábbi kutatások során megállapították, hogy az autoantitestek az A β (21-37) szekvenciához kapcsolódnak, ami egy hidrofil és egy erősen hidrofób részből áll.

Az epitópok általában több töltött, hidrofil aminosavat tartalmaznak, ezért feltételezték, hogy az A β (22-28) (²²EDVGSNK²⁸) felelős a kötődés kialakításáért. Ennek bizonyítására többféle epitópot és konjugátumot is előállítottak.

1. Biotinált származékok

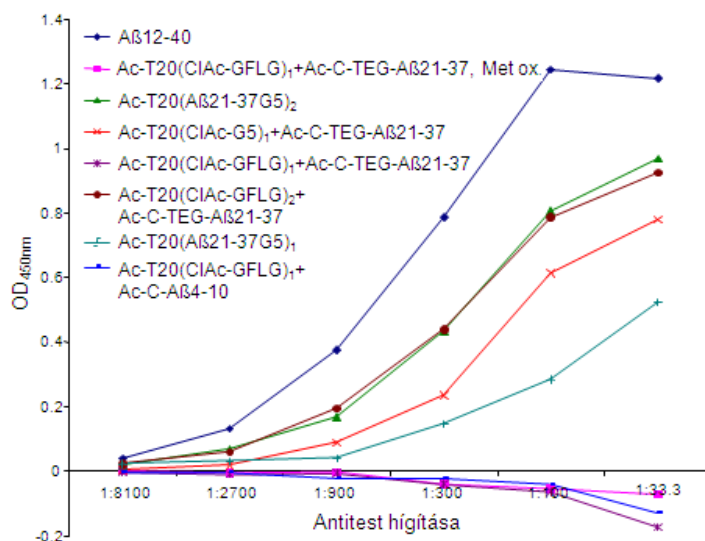
A különböző epitóp szekvenciákhoz egy pentaglicin távtartó szekvenciát (spacert) és biotint kapcsoltak. Az ELISA vizsgálatok során a lemezhez sztreptavidint kötöttek, és így vizsgálták az antigéneket. A sztreptavidin – biotin erős kölcsönhatás eredményezi a rövidebb peptidek felülethez történő kötődését, kitapadását. Az eredmények alapján a biotinált származékok közül csak A β (12-40) mutatott kötődést az autoantitestekkel, a többi szekvencia nem. Ez valószínűleg az eltérő konformációk és oldhatóság miatt lehetséges.

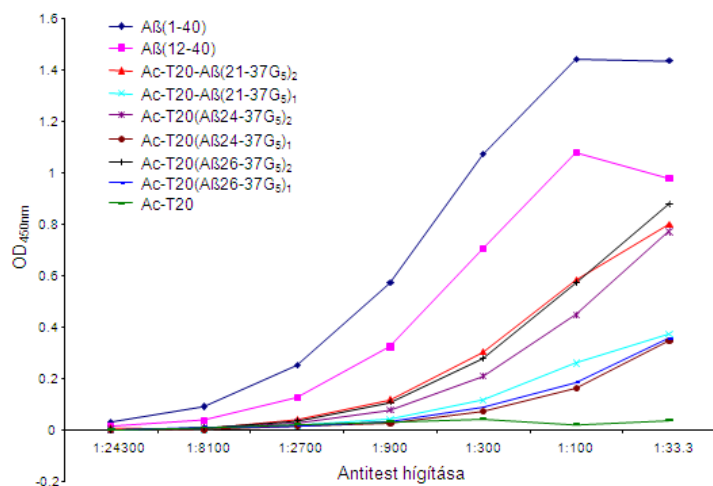


2. Biokonjugátumok

Az oldhatóság és az epitópok hozzáférhetőségének növelésére a β -amiloid epitópokat tetrafluorszin-származékhoz (OT20) konjugálták. A konjugációhoz tioéter kötést alkalmaztak, ezért az OT20-at klór-acetilezték, míg az epitópokhoz egy ciszteint és egy oldhatóságot növelő spacer, tetraetilén-glikolt (TEG) kapcsolnak. Így nem változott meg a térszerkezet, megmaradt az autoantitestek kötődése. A biokonjugátumokat ELISA módszerrel vizsgálták, és az eredményekből megállapították, hogy a kötődéshez nem elegendő az A β (22-28) szekvencia, hanem szükséges a hidrofób rész jelenléte is.

A továbbiakban megvizsgálták, hogy a kötődés függ-e attól, hogy hány darab epitóp kapcsolódik az oligotuftsin hordozóhoz. Előállítottak egy illetve két epitópot tartalmazó konjugátumokat, majd ELISA módszerrel vizsgálták azokat. A görbék alapján látható, hogy az egy epitópot tartalmazó konjugátumok nem vagy alig, míg a két epitópot tartalmazó konjugátumok viszonylag jó kötődést mutattak.





Az eredmények azt mutatják, hogy az epitópok számának növelésével növekszik az ellenanyag kötődésének nagysága, ezért a cél az volt, hogy a hordozóhoz minél több β -amiloid epitópot kapcsoljanak. A konjugálást nehezítette a β -amiloid epitóp rossz oldhatósága.

Az aggregálódó β -amiloid epitóp peptidok között sokkal könnyebben alakult ki diszulfidhíd, mint a tioéter-kötés a hordozó és az epitóp között. Így a kémiai ligáció reakcióelegye a különböző számú epitópot tartalmazó konjugátumok keverékét tartalmazta, amelyek elválasztása egymástól nem volt teljesen megoldható. Ezért a figyelem a totálszintézis felé fordult. Az akkor elérhető gyantákon (pl. MBHA) nem lehetett két epitópnál többet szintetizálni a hordozóhoz, ezért olyan konjugátumokat építettek fel, melyek egy vagy két epitópot tartalmaztak. Az epitópotokat egy pentaglicin spacerrel hosszabbították, majd az így kialakított konjugátumok autoantitest-kötődését is vizsgálták. Az ELISA görbékből látható, hogy a totálszintézissel kialakított biokonjugátumok esetén is a két epitópot tartalmazók mutattak az autoantitestekkel jobb kötődést.

Ezért a feladat a több epitóp kapcsolásához megfelelő gyanta megtalálása és a megfelelő biokonjugátumok szintetizálása lett.

3 Célkitűzések

Az előzetes kísérletek alapján, a német együttműködő partner kívánságát is figyelembe véve olyan β -amiloid epitóp peptid konjugátumokat kívántunk előállítani, amelyek nem tartalmaznak pentaglicin távolságtartó (spacer) szekvenciát és minden tuftsín egységhez kapcsolódik egy epitóp peptid. Mivel az epitóp peptidek oldékonysága nagyon rossz, továbbá a peptidláncok aggregációja a ciszteint tartalmazó változatok gyors oxidációjához vezetett, a kémiai ligációs módszer helyett totálszintézis megvalósítását tűztük ki célként. Azonban a korábbi totálszintézisre alkalmazott gyanták (MBHA, Rink Amide MBHA) csak egy, maximum két epitóp beépítését tették lehetővé tetratuftsín-származékokra (OT20). Ezért a munkámban egy új polietilén-glikol alapú, kis kapacitású gyantát (ChemMatrix[®]) szerettem volna kipróbálni.

Tehát a dolgozatomban összefoglalt munka célja β -amiloid epitóp peptid konjugátumok totálszintézise kis kapacitású polietilén-glikol (PEG) alapú gyantán, valamint az előállított biokonjugátumok ellenanyagkötő képességének vizsgálata. Ezekkel a biokonjugátumokkal végzett vizsgálatok hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a jövőben Alzheimer-kór elleni szintetikus oltóanyagokat, és/vagy megfelelő immundiagnosztikumokat állítsunk elő, amelyeket a betegség felismerésében és terápiájában alkalmazhatnak.

A fentieknek megfelelően tehát célom volt:

- Kis kapacitású ChemMatrix[®] gyantán négy különböző konjugátum totálszintézise. Két különböző hosszúságú hordozóhoz az epitóp hosszabb illetve rövidebb szekvenciájának kiépítése.
- A konjugátumok előállítására alkalmas, megfelelően védett oligotuftsín hordozók (Ac-Thr(^tBu)-Lys(Boc)-Pro-Lys(Mtt)-Gly]_n-R; ahol n = 2 vagy 4, R pedig a gyantát jelöli) előállítása. Mivel totálszintézis akkor alkalmazható, ha van olyan oldallánc védőcsoport, mely szelektíven hasítható, ezért 4-metil-tritil-csoporttal védett lizint tartalmazó láncot választottam. A hordozó változtatásával azt szerettem volna vizsgálni, hogy elég-e a dimer, vagy szükséges a tetratuftsín a megfelelő hatás kiváltásához.
- Két különböző hosszúságú β -amiloid epitóp peptid (²¹Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly³⁷ és ³⁰Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly³⁷)

szintézise a két különböző hosszúságú hordozóhoz. Ezek segítségével a későbbiekben meghatározható az a minimális aminosavszekvencia, amely szükséges az autoantitestek megfelelő erősséggel való kötődéséhez.

- A vegyületek tisztítása és jellemzése.
- A kész oligotuftsin alapú elágazó láncú polipeptidek ellenanyagkötő képességének vizsgálata ELISA módszer segítségével.

4 Eredmények

A célkitűzéseimnek megfelelően előállítottam a négy különböző vegyületet, amelyekben két eltérő hosszúságú oligotuftsín hordozóhoz a β -amiloid epitóp egy hosszabb ($A\beta(21-37)$) vagy egy rövidebb ($A\beta(30-37)$) változatának kettő vagy négy kópiáját kapcsoltam.

Korábbi vizsgálatok alapján a β -amiloid epitóp 1M-os K_2CO_3 -DMF oldatban tetratuftsinszármazékhoz (OT20) kemoszelektív ligációval (tioéter-kötés kialakítása) konjugálható, de főleg csak két-három epitópot tartalmazó konjugátumot sikerült előállítani. Ez elsősorban az epitóp peptidek rossz oldékonyságával és azok aggregációs hajlamával magyarázható. Ezért első lépésben a ligáció körülményeinek optimalizálásával foglalkoztam. Az eddigi vizsgálataim során az epitópokat új körülmények között, Tris-puffer és 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-prop-2-ol (HFIP) elegyében reagáltattam a hordozó molekulával. Bár ebben az oldatban az epitóp jól oldódik, de a konjugáció nem játszódott le. Tehát a kísérleti körülmények további optimalizálására, illetve olyan oldószerrelegy megtalálására van szükség, amelyben a komponensek oldhatók, és a kémia ligáció is hatékonyan lejátsszódik.

A β -amiloid epitóp oldhatatlansága, illetve a konjugáció rossz hatásfoka miatt a biokonjugátumok előállítására újra elővettük a totálszintézis módszerét. A korábbi kísérletek azonban azt mutatták, hogy a hagyományos polisztirol-divinilbenzol kopolimer alapú gyantákban csak olyan konjugátumok állíthatók elő, amelyek csak egy vagy két β -amiloid epitóp peptidláncot tartalmaznak az OT20 hordozón. Több elágazó peptidlánc esetén, néhány aminosav beépítése után a szintézis leállt és a leghatékonyabb kapcsolási eljárásokkal sem lehetett több aminosavat hatékonyan beépíteni (Mező és mtsai, nem közölt adat). Ezért munkámban azt a PEG-alapú ChemMatrix[®] gyantatípust alkalmaztam, amelyen már sikeresen felépítették az $A\beta(1-42)$ szekvenciát is.

A munkám során a peptideket manuálisan, szilárdfázisú peptidszintézissel állítottam elő Fmoc/^tBu stratégiával. A nyers peptideket fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékromatográfiával tisztítottam, majd a termékeket tömegspektrométerrel vizsgáltuk.

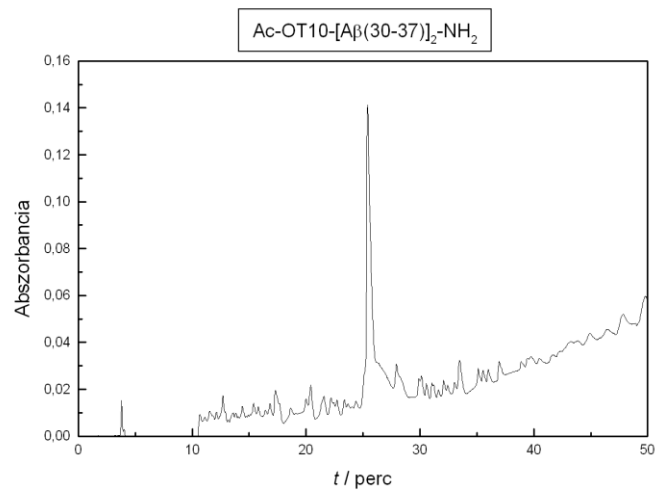
A kész biokonjugátumok ellenanyagkötő képességét ELISA módszerrel tanulmányoztuk.

4.1 Peptidek szintézise

4.1.1 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly]₂-NH₂ (Ac-OT10-[Aβ(30-37)]₂-NH₂) szintézise

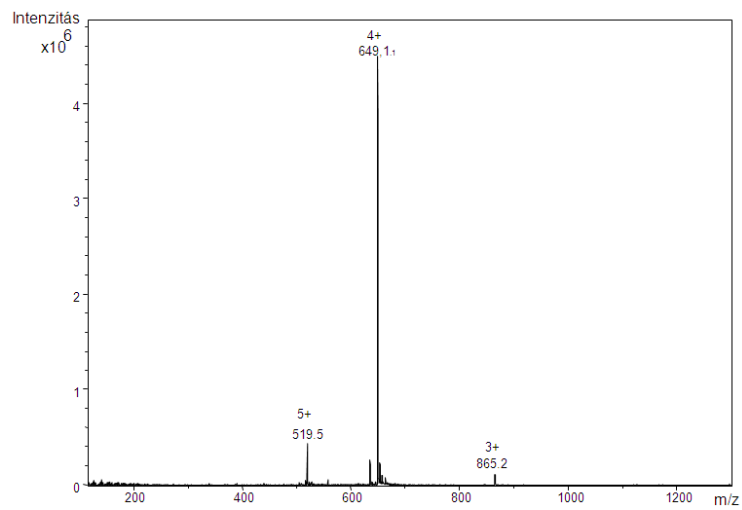
A szintézishez Rink Amide ChemMatrix[®], kis kapacitású, polietilén-glikol alapú gyantát és Fmoc/^tBu technikát alkalmaztam. A védett aminosavakból és a kapcsolási reagensekből a gyantakapacitásra számolt három ekvivalens mennyiséget használtam. Az Fmoc-védőcsoport hasítása 2% piperidin – 2% DBU/DMF eleggyel, az aminosavak kapcsolása DIC/HOBt keverékével történt. Először az oligotuftsín peptidgerincet (dekapeptid) építettem fel a gyantán, majd az utolsó aminosav beépítése után acetileztem (Ac₂O - DIEA/DMF eleggyel) a peptid *N*-terminálisát. A tuftsín egységek negyedik pozíciójába egy 4-metil-tritil-csoporttal védett lizint építettem. Ez az oldallánc védőcsoport szelektíven hasítható 2% TFA – 2% TIS / DCM eleggyel; a reakció során az oldat sárgává válik a lehasadó termék miatt. Az elegyet a hasítás után 10% DIEA/DCM eleggyel semlegesítettem, majd a szintézist az amiloid epitóppal folytattam, amely során már a gyantakapacitásnak megfelelő hat ekvivalens mennyiséget használtam. Az Aβ(30-37) szekvencia szintézise után a gyanta feléről TFA/desztillált víz eleggyel fenol, 1,2-etánditiol (EDT) és tioanizol gyökfogók és redukálószeres hozzáadása után lehasítottam a peptidet. Ekkor az oldallánc védőcsoportok is lehasadtak. A hasítóelegyből a szabad peptidet éterrel csaptam ki, majd a szilárd anyagot tömény ecetsavban oldottam. A peptid oldatát szárazjég / aceton keverékkel való fagyasztás után liofilizáltam. A nyers terméket nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) tisztítottam. A nyers peptid az általánosan alkalmazott oldószerekben nem oldódott jól, ezért fluorozott oldószert (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-izopropanol) is alkalmaztam a feloldásához. A végterméket tömegspektrometria segítségével azonosítottam és tisztaságát analitikai HPLC-vel ellenőriztem.

A tisztított biokonjugátum analitikai HPLC kromatogramja:



(KNAUER HPLC rendszer, Phenomenex Luna C18, 5 μ 100 \AA , 250 \times 4,60 mm; A eluens: 0,1% TFA / desztillált víz, B eluens: 0,1% TFA/acetonitril + víz (80:20), gradiens elúció: 0. perc: 0% B, 5. perc 0% B, 50. perc 90% B; áramlási sebesség : 1 ml/perc; $\lambda=220$ nm)

A tiszta termék MS spektruma:



12. ábra Ac-OT10-[A β (30-37)]₂-NH₂

(ESI-MS, Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus; oldószer: 50% acetonitril-víz elegy; sebesség: 240 μ l/h; tartomány: 50-2000 m/z)

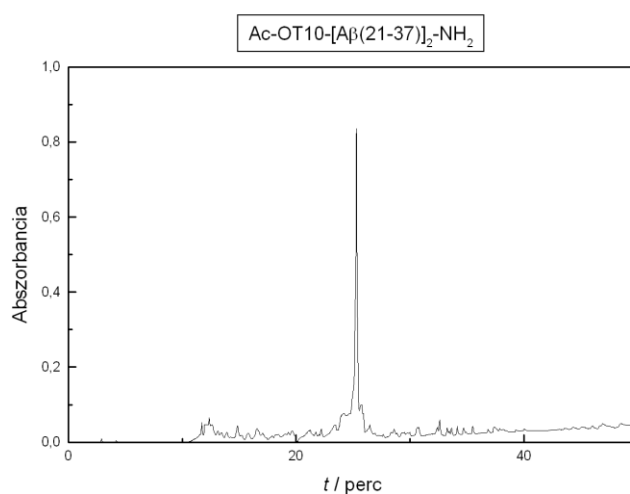
A molekula várt tömege: 2591,3

Mért molekulatömeg: 2591,6

4.1.2 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly]₂-NH₂ (Ac-OT10-[Aβ(21-37)]₂-NH₂) szintézise

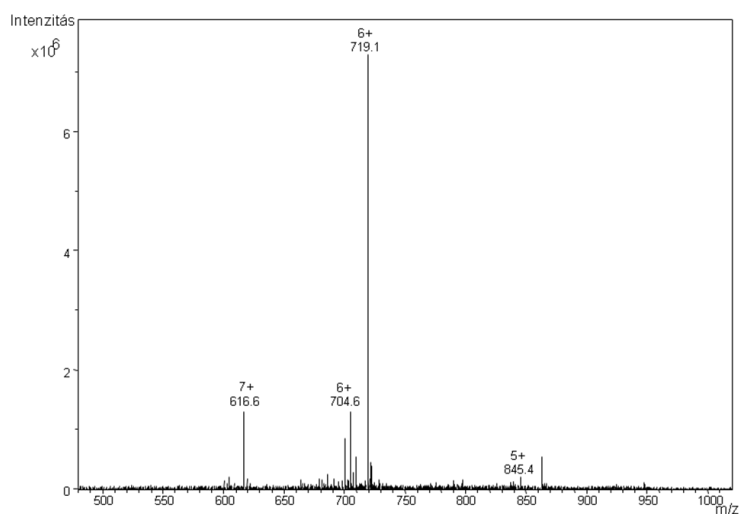
A gyanta másik felén folytattam az Aβ(21-37) epitóp szekvencia szintézisét Fmoc/^tBu stratégiával. A teljes ²¹AEDVGSNKGAIIGLMVG³⁷ β-amiloid szekvencia felépítése után a peptidet a gyantáról ebben az esetben is TFA / desztillált víz elegyével, gyökfogók és redukálószerrel (fenol, EDT és tioanizol) hasítottam. A nyers peptidet metanol-víz elegyben oldva HPLC-vel tisztítottam, majd a végterméket az előzőek alapján jellemeztem.

A tisztított termék analitikai HPLC kromatogramja:



(KNAUER HPLC rendszer, Phenomenex Luna C18, 5μ 100Å, 250 × 4,60 mm; A eluens: 0,1% TFA / desztillált víz, B eluens: 0,1% TFA/acetonitril + víz (80:20), gradiens elúció: 0. perc: 0% B, 5. perc 0% B, 50. perc 90% B; áramlási sebesség : 1 ml/perc; λ=220 nm)

A tiszta termék MS spektruma:



13. ábra Ac-OT10-[Aβ(21-37)]₂-NH₂

(ESI-MS, Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus; oldószer: 50% acetonitril-víz elegy; sebesség: 240 μl/h; tartomány: 50-2000 *m/z*)

A molekula várt tömege: 4308,1

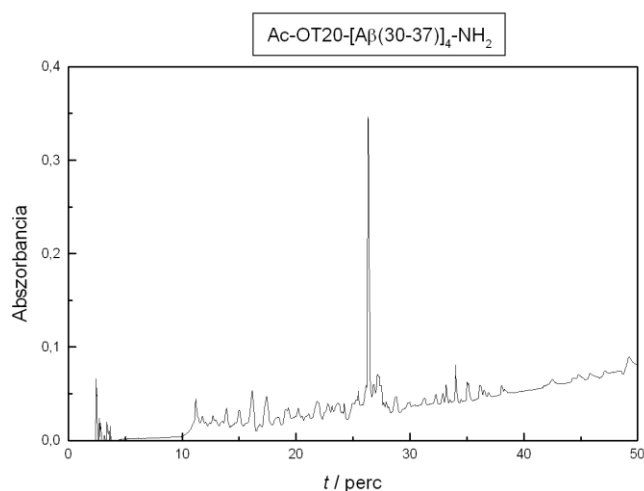
Mért molekulatömeg: 4308,6

4.1.3 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly]₄-NH₂ (Ac-OT20-[Aβ(30-37)]₄-NH₂) szintézise

Ennél a szintézisnél is Rink Amide ChemMatrix[®] (PEG-alapú) gyantát és Fmoc/^tBu technikát alkalmaztam. Az aminosav-származékokból és a kapcsolószerekből ekkor is a gyantakapacitásra számolt három ekvivalens mennyiséget használtam. Először itt is az oligotuftsin hordozót szintetizáltam, de ebben az esetben 4 ismétlődő peptidszekvenciát építettem fel (20 aminosav) az előzőekben leírt decapeptid helyett, majd az utolsó treonin után acetileztem (Ac₂O - DIEA/DMF eleggyel) a peptidlánc *N*-terminálisát. Az ismétlődő szekvenciák negyedik pozíciójában lévő lizin ε-aminocsoport védőcsoportja itt is 4-metil-tritil volt, így ezt szelektíven tudtam hasítani 2% TFA – 2% TIS/DCM eleggyel. A reakció végbemenetelét sárga szín jelezte. (Amikor már nem sárgul az oldat, a reakció befejezettnek tekinthető.) Ezután az elegyet 10% DIEA/DCM eleggyel semlegesítettem. A szintézist a gyantakapacitásnak megfelelő tizenkétszeres mennyiségű aminosav és kapcsolószere felesleggel folytattam. A rövidebb β-amiloid epitóp (Aβ(30-37)) szekvencia szintézise után a gyantát kétfelé osztottam, majd az egyik feléről TFA / desztillált víz eleggyel gyökfogók és redukálószerek (fenol, EDT, tioanizol) hozzáadása után lehasítottam a peptidet. A hasítás

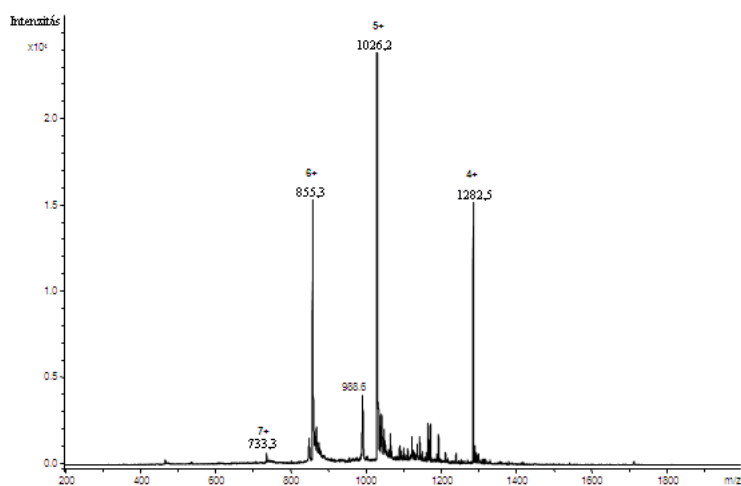
során lehasadtak az oldallánc védőcsoportok is. A hasítóelegyből a szabad peptidet éterrel csaptam ki, majd a szilárd anyagot tömény ecetsavban oldottam. Végül a peptid oldatát szárazjég/aceton keverékkel való fagyasztás után liofilizáltam. A nyerterméket az oligotuftsin oldékonyságot növelő hatása miatt fel tudtam oldani metanol-víz elegyben, majd HPLC-vel tisztítottam. A végterméket tömegspektrometria segítségével azonosítottam és tisztaságát analitikai HPLC-vel ellenőriztem.

A főfrakció analitikai HPLC kromatogramja:



(KNAUER HPLC rendszer, Phenomenex Luna C18, 5 μ 100 \AA , 250 \times 4,60 mm; A eluens: 0,1% TFA / desztillált víz, B eluens: 0,1% TFA/acetonitril + víz (80:20), gradiens elúció: 0. perc: 0% B, 5. perc 0% B, 50. perc 90% B; áramlási sebesség : 1 ml/perc; $\lambda=220$ nm)

A tiszta termék MS spektruma:



14. ábra Ac-OT20-[A β (30-37)]₄-NH₂

(ESI-MS, Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus; oldószer: 50% acetonitril-víz elegy; sebesség: 240 μ l/h; tartomány: 50-2000 m/z)

A molekula várt tömege: 5125,5

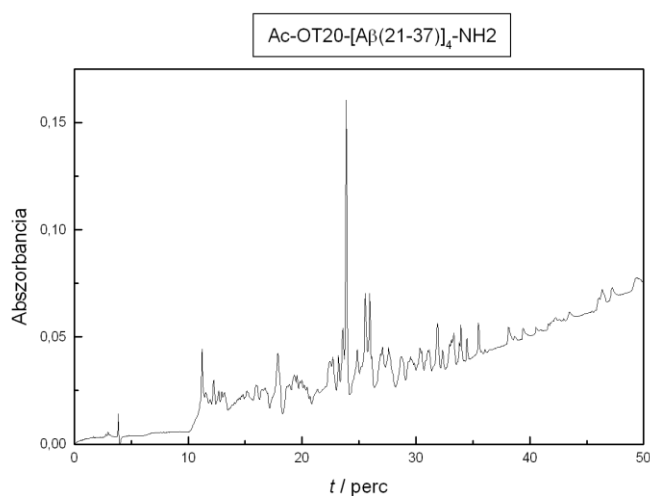
Mért molekulatömeg: 5126,0

4.1.4 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly]₄-NH₂ (Ac-OT20-[Aβ(21-37)]₄-NH₂) szintézise

A gyanta másik felén az eddig felépített rövidebb ³⁰AIIGLMVG³⁷epitóp után folytattam az Aβ(21-37) szintézisét. A hosszabb β-amiloid szekvencia megépítése után a peptidet a gyantáról szintén TFA / desztillált víz elegyével, gyökfogók és redukálószerrel (fenol, EDT és tioanizol) hasítottam le, majd az így kapott nyers peptidet HPLC-vel tisztítottam.

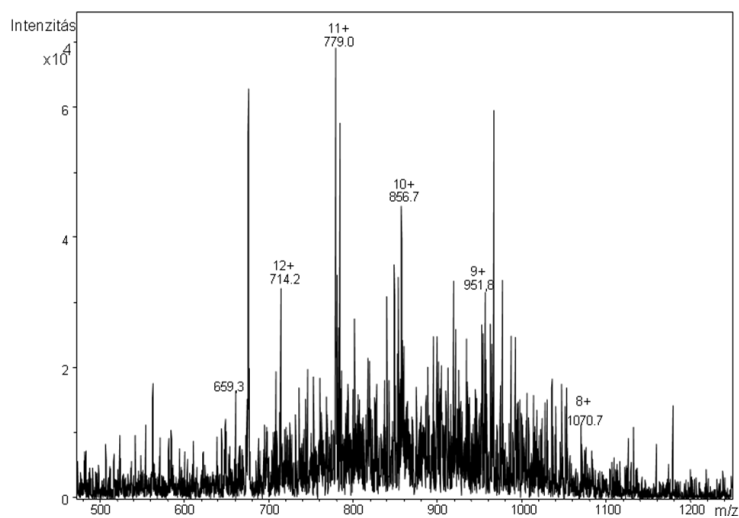
A tisztítás során kapott anyag nem megfelelő tisztasága miatt ebből a mintából nem végeztek biológiai vizsgálatokat.

A tisztított frakció analitikai HPLC kromatogramja:



(KNAUER HPLC rendszer, Phenomenex Luna C18, 5μ 100Å, 250 × 4,60 mm; A eluens: 0,1% TFA / desztillált víz, B eluens: 0,1% TFA/acetonitril + víz (80:20), gradiens elúció: 0. perc: 0% B, 5. perc 0% B, 50. perc 90% B; áramlási sebesség : 1 ml/perc; λ=220 nm)

A tisztított termék MS spektruma:



15. ábra Ac-OT20-[Aβ(21-37)]₄-NH₂

(ESI-MS, Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus; oldószer: 50% acetonitril-víz elegy; sebesség: 240 μl/h; tartomány: 50-2000 *m/z*)

A molekula várt tömege: 8557,1

Mért molekulatömeg: 1.) 8557,4

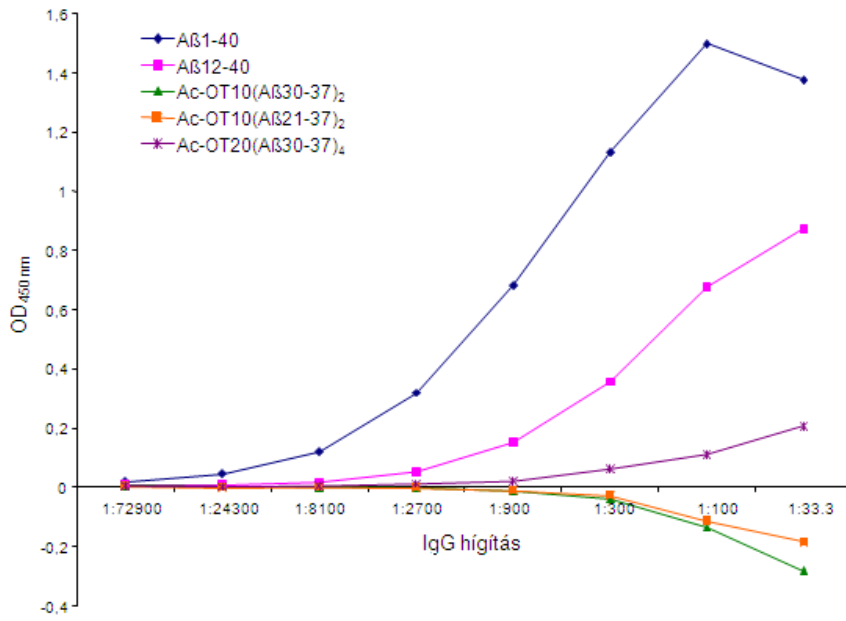
2.) 8686,2

4.2 Biológiai vizsgálatok: a konjugátumok ellenanyagkötő képességének vizsgálata ELISA módszerrel

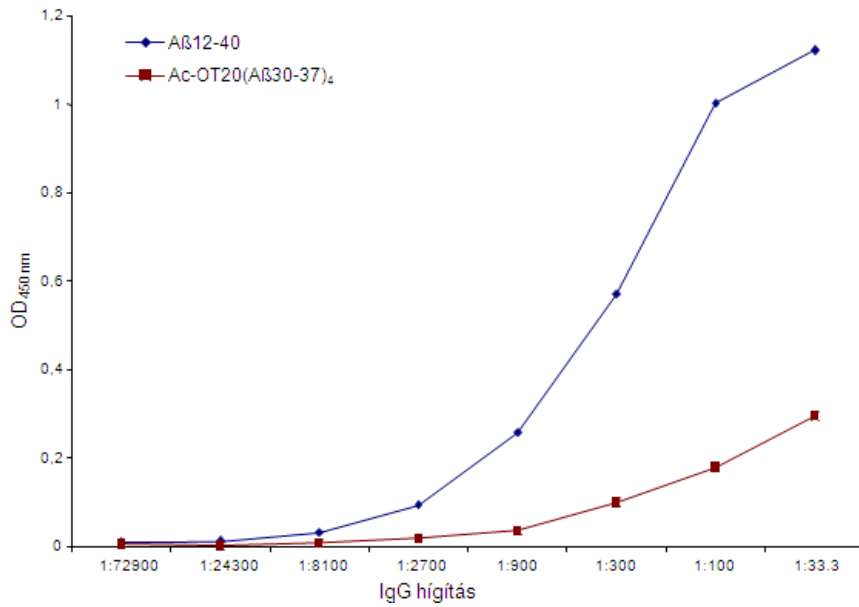
A szintetizált biokonjugátumok antitestkötő képességét indirekt ELISA módszerrel vizsgálták a német partner egyetemen. A mérés során meghatározták, hogy az autoantitestek felismerik-e és ha igen, akkor milyen mértékben, a különböző hosszúságú hordozók β -amiloid epitópokkal alkotott konjugátumait.

Először a mikrotitrációs lemezt érzékenyítették az antigén oldatával, majd inkubálás után mosták a mosópufferrel. A nem specifikus kötőhelyeket blokkolták marha szérum albuminnal (BSA), utána újra mosták a lemezt. A lyukakba humán immunglobulin G (IgG) készítményt (mely tartalmazta az autoantitesteket) pipettáztak különböző koncentrációkban, a lemezt inkubálták, majd a nem specifikus antitesteket alaposan kimosták. A „második ellenanyagot”, a peroxidáz enzimmel konjugált, humán ellenanyagot felismerő kecske IgG-t hozzáadták a lemezhez, majd mind a mosó pufferrel, mind a szubsztát pufferével mosták. Ezután orto-feniléndiamin-dihidrokloridot és hidrogén-peroxidot pipettáztak a lyukakba, és 8 perc után 450 nm-en meghatározták az abszorbanciát. A mérés során referenciának $A\beta(1-40)$ -et és $A\beta(12-40)$ -et használtak.

Az ELISA vizsgálatokat az $Ac-OT10-[A\beta(30-37)]_2-NH_2$, $Ac-OT10-[A\beta(21-37)]_2-NH_2$ és $Ac-OT20-[A\beta(30-37)]_4-NH_2$ anyagokon végezték el. A kapott görbék alapján látható, hogy a dituftsín-hordozó konjugátumai nem mutatnak kötődést, míg a tetra tuftsín $A\beta(30-37)$ epitóppal alkotott konjugátuma kis mértékben kötődik az autoantitestekhez, de nem éri el a korábban vizsgált konjugátumok kötődési erősségét.



16. ábra A három biokonjugátum ELISA vizsgálata



17. ábra A tetraaftsin-konjugátum ELISA eredménye

4.3 Eredmények összefoglalása

Munkám során szilárdfázisú peptidszintézissel előállítottam a két különböző hosszúságú oligotuftsinhoz szintetizált rövidebb (A β (30-37)) és hosszabb (A β (21-37)) amiloid epitópokat tartalmazó biokonjugátumokat. A nyers peptideket fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) tisztítottam, a tisztított termékeket tömegspektrometriával azonosítottuk, tisztaságukat analitikai HPLC-vel ellenőriztem.

A kész biokonjugátumok autoantitest-kötő képességét indirekt ELISA módszerrel vizsgálta a német partner. A három vizsgált konjugátomból kettő, a dituftsin-származékok nem, míg az OT20-konjugátum kismértékű kötődést mutatott.

A korábbi kísérletekkel összevetve megállapítható, hogy a hordozó hosszúsága nem rövidíthető le, mindenképpen szükséges a tetratuftsin a konjugátumok szintéziséhez. A minimális β -amiloid epitóp tartalmazza az A β (30-37) szekvenciát, de valószínűleg szükséges a teljes A β (21-37) szekvencia a megfelelő kötődés kialakításához. Mivel a munka során szeretnénk volna megállapítani, hogy elegendő-e a pentaglicin spacer nélküli konjugátumok, így ezeket összehasonlítva a korábbi eredményekkel kijelenthető, hogy szükség van a G₅-távtartó egységre, hogy az autoantitestek megfelelően tudjanak kötődni az antigénekhez.

Ennek megfelelően a továbbiakban tervezzük a pentaglicinnel és/vagy a natív szekvenciával a C-terminálison meghosszabbított epitópot tartalmazó biokonjugátumok előállítását ChemMatrix[®] gyantán totálszintézissel. Szintén érdemes lesz megfontolni a metionin cseréjét norleucinra, mivel a redukálószer alkalmazása ellenére jelentős mennyiségben kaptunk oxidált metionin tartalmú származékokat a peptid gyantáról történő hasításakor. Ez különösen a négy epitópot tartalmazó konjugátumok tisztítását teszi nehezzé.

5 Kísérleti rész

A dolgozatomban szereplő peptideket manuálisan, lépésenkénti (stepwise) szilárdfázisú peptidszintézissel állítottam elő. A szintézist egy szűrővel ellátott 20 ml-es fecskendőben végeztem, amit vízlégszivattyúhoz csatlakoztattam.

5.1 Peptidek szintézise

5.1.1 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)]₂-NH₂ (Ac-OT10-[Aβ(30-37)]₂-NH₂) előállítása, tisztítása, analízise

A szintézist Fmoc/^tBu technikával végeztem, amelynek a protokollja az alábbi táblázatban látható:

2. táblázat Fmoc/^tBu stratégia protokollja

	Alkalmazott reagens	Időtartam
Mosás	DMF	3 x 0,5-1 perc
Fmoc-csoport hasítása	2% piperidin – 2% DBU/DMF	2 x 2 perc
		1 x 5 perc
		1 x 10 perc
Mosás	DMF	8 x 0,5-1 perc
Kapcsolás	3 ekv. aminosav-származék +3 ekv. DIC/HOBt (DMF)	1 x 60 perc
Mosás	DMF	3 x 0,5-1 perc
	DCM	2 x 0,5-1 perc
Kaiser-teszt	Ninhidrin oldat, KCN oldat, fenol oldat	1 x 3-5 perc

Sikertelen kapcsolás esetén DMF-es mosás után megismételtem a kapcsolást.

A szintézishez 0,4 g 0,49 mmol / g kapacitású Rink Amide ChemMatrix[®] gyantát használtam, illetve a gyantakapacitásra számolt 3 ekvivalensnyi mennyiségű aminosav-származékot és kapcsoló reagenseket. Ez jelen esetben 0,588 mmol mennyiséget jelentett. Először a két tuftsin egységet tartalmazó, megfelelően védett oligotuftsin (OT10) hordozót szintetizáltam a gyantán. A tuftsin egységek második pozíciójában lévő lizin oldalláncán Boc-védőcsoport,

míg a negyedik helyen lévön Mtt-védőcsoport volt, a treonin funkciós csoportját ^tBu-védőcsoport védte. Az OT10-származék szintézise után az *N*-terminálist acetileztem 1 ml Ac₂O, 1 ml DIEA és 3 ml DMF elegyével. A reakció szobahőmérsékleten 30 perc alatt játszódott le.

Ezután a β -amiloid epitópot a negyedik helyen lévő Lys oldallácán építettem fel. Ehhez először az Mtt-csoportot hasítottam. A gyantát először 2% TFA/DCM eleggyel mostam, amíg az oldat sárga nem lett. Ezután 2% TIS-t adtam a hasító elegyhez, és 2+5+10+30 percig hasítottam; ekkor már nem volt sárga az oldat. A peptid-gyantát a protokollnak megfelelően 10% DIEA/DCM oldattal semlegesítettem, majd DCM-es mosás után folytattam a szintézist. Az A β (30-37) szekvencia kiépítéséhez a gyantakapacitásnak megfelelő hat ekvivalens mennyiséget alkalmaztam az aminosav-származékokból és a kapcsolószerekből. A szintézis után az elágazások *N*-terminálisáról lehasítottam az Fmoc-csoportokat, majd a gyantát két egyenlő részre osztottam.

3. táblázat A szintézishez használt aminosav-származékok és kapcsolószerek mennyisége

Aminosav-származékok	Moláris tömeg / g/mol	Szükséges mennyiség / g
Fmoc-Gly-OH	297,31	0,175
Fmoc-Lys(Mtt)-OH	624,79	0,367
Fmoc-Pro-OH	337,38	0,198
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,55	0,276
Fmoc-Thr(^t Bu)-OH	397,47	0,234
Fmoc-Gly-OH	297,31	0,350
Fmoc-Val-OH	339,39	0,399
Fmoc-Met-OH	371,45	0,437
Fmoc-Leu-OH	353,41	0,416
Fmoc-Ile-OH	353,41	0,416
Fmoc-Ala-OH	311,33	0,366
Kapcsolószerek	Moláris tömeg / g/mol	Szükséges mennyiség
HOBt (12% H ₂ O)	153,13	0,090 g
DIC	126,20	91 μ l
HOBt (12% H ₂ O)	153,13	0,180 g
DIC	126,20	182 μ l

A vastag vonal feletti adatok az oligotuftsin rész, míg az alatta levő adatok az epitóp peptidláncok kialakításához szükséges mennyiségeket mutatják.

A gyanta egyik feléről a kész peptidet 10 ml trifluor-ecetsav és 0,5 ml víz elegyével, 0,75 g fenol, 0,5 ml tioanizol és 0,25 ml 1,2-etánditiol gyökfogók hozzáadása után lehasítottam a gyantáról. A reakciót 15 percig jeges hűtés mellett, majd 1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten végeztem. Az elegyet 0°C-ra hűtött éterbe szűrtem, majd a kicsapódott peptidet 10 percig centrifugával 4000 fordulat / perc sebességgel üleptettem. Az étert dekantáltam, és az üledéket még háromszor éterrel hasonló módon mostam. A peptidet 100%-os ecetsavban sem tudtam oldani, ezért szuszpenzió formában liofilizáltam.

A kapott nyerstermék tömege: 128 mg.

Termelés: 50,4 %

A nyers peptidet fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC), félpreparatív oszlopon tisztítottam. A peptidet 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-prop-2-olban oldottam, majd A eluenssel hígítottam.

A tisztítást KNAUER HPLC rendszeren (2db K120 pumpa, nagynyomású keverőegység, K2501 típusú monokromátoros UV detektor, adatgyűjtő szoftver) végeztem. A detektálást $\lambda=220$ nm hullámhosszon végeztem. (A többi peptid tisztítását is ezzel a rendszerrel végeztem.)

Az alkalmazott oszlop típusa: Phenomenex Jupiter C18, 10 μ , 300 Å , mérete: 250 \times 10 mm.

A használt eluensek: A eluens: 0,1% TFA / desztillált víz

B eluens: 0,1% TFA / metanol + víz (90:10)

A tisztítás során gradiens elúciót használtam, az áramlási sebesség 4 ml / perc volt:

0. perc	45 % B
5. perc	45 % B
60. perc	90 % B

A tisztítási veszteség: 20%.

A peptidek tisztaság-analízisét analitikai RP-HPLC-vel illetve tömegspektrométerrel végeztem.

A használt eluensek: A eluens: 0,1% TFA / desztillált víz

B eluens: 0,1% TFA / acetonitril + víz (80:20)

Az alkalmazott analitikai oszlop típusa: Phenomenex Luna C18, 5 μ , 100 Å , mérete: 250 \times 4,60 mm

Gradiens elúciót alkalmaztam 1 ml / perces áramlási sebesség mellett:

0. perc	0 % B
5. perc	0 % B
50. perc	90 % B

Detektálási hullámhossz: $\lambda=220$ nm

A tömegspektrometriás mérésekhez elektropray ionizációs (ESI-MS) Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus típusú készüléket használtunk.

A vegyületeket 50% acetonitril-víz elegyében oldottuk fel. Folyamatos mintaadagolás mellett (sebesség 240 μ l/h) 50-2000 m/z tartományban, pozitív üzemmódban vettük fel a spektrumokat.

5.1.2 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly]₂-NH₂ (Ac-OT10-[A β (21-37)]₂-NH₂) előállítás, tisztítása, analízise

Az Ac-OT10-[A β (30-37)]₂-NH₂ szintéziséhez használt a gyanta másik felén (0,2 g kiindulási gyanta mennyiség) folytattam a hosszabb epitóp kiépítését. A β -amiloid epitóp lizin ϵ -aminocsoportját *tert*-butiloxikarbonil, a szerin hidroxilcsoportját illetve az aszparaginsav és glutaminsav ^oCOOH csoportját *tert*-butil, míg az aszparagin funkciós csoportját tritil védőcsoport védte.

A teljes szekvencia felépítése után lehasítottam az amino-terminálisról az Fmoc-csoportot, majd a peptidet a gyantáról szintén 10 ml trifluor-ecetsav és 0,5 ml víz elegyével, 0,75 g fenol, 0,5 ml tioanizol és 0,25 ml 1,2-etánditiol gyökfogók hozzáadása után hasítottam. Ezt 15 percig jeges hűtés után még 1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten végeztem. Az elegyet 0°C-ra hűtött éterbe szűrtem, majd a kicsapódott peptidet 10 percig 4000 fordulat / perc sebességgel centrifugáltam. Az étert dekantáltam, majd a peptidet még háromszor éterrel mostam. A peptidet 100%-os ecetsavban sem tudtam teljesen oldani, így liofilizáltam.

4. táblázat A szintézis során használt aminosav-származékok és kapcsolószerek mennyisége

Aminosav-származékok	Moláris tömeg / g/mol	Szükséges mennyiség / g
Fmoc-Gly-OH	297,31	0,175
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,55	0,276
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,67	0,351
Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	383,44	0,226
Fmoc-Val-OH	339,39	0,200
Fmoc-Asp(O ^t Bu)-OH	411,45	0,242
Fmoc-Glu(O ^t Bu)-OH	425,47	0,250
Fmoc-Ala-OH	311,33	0,183
Kapcsolószerek	Moláris tömeg / g/mol	Szükséges mennyiség
HOBt (12% H ₂ O)	153,13	0,090 g
DIC	126,20	91 µl

A nyers termék tömege: 345 mg

Termelés: 81,7 %

A nyers peptidet RP-HPLC-vel, félpreparatív oszlopon tisztítottam. A peptidet ebben az esetben sikerült metanol-víz elegyben (1:1, V/V) oldani. A tisztítást az 5.1.1 fejezetben leírt rendszeren és eluensekkel végeztem.

A tisztítás során gradiens elúciót használtam, az áramlási sebesség 4 ml / perc volt:

0. perc	45 % B
5. perc	45 % B
50. perc	90 % B

A tisztítási veszteség: 27%.

5.1.3 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly]₄-NH₂ (Ac-OT20-[Aβ(30-37)]₄-NH₂) előállítása, tisztítása, analízise

A szintézist az előzőekkel egyező módon, szilárdfázisú peptidszintézissel, Fmoc/^tBu technikával végeztem.

A szintézishez 0,4 g 0,49 mmol/g kapacitású Rink Amide ChemMatrix[®] gyantát, illetve 3 ekvivalensnyi mennyiségű aminosav-származékokat és kapcsolási reagenseket használtam. Ebben az esetben ez 0,588 mmol anyagmennyiséget jelentett. A peptid előállítása során

először a négy tuftsin egységet tartalmazó, védett oligotuftsin vázat (OT20) szintetizáltam meg a gyantán. A negyedik treonin felkapcsolása után lehasítottam a Fmoc *N*-terminális védőcsoportot, majd 1 ml Ac₂O, 1 ml DIEA és 3 ml DMF elegyével acetileztem. A reakció fél óra alatt zajlott le. Ezután az Mtt oldallánc-védőcsoportot lehasítottam a tuftsin egységek második pozíciójában található lizin ε-aminocsoportjáról 2% TFA + 2% TIS/DCM eleggyel (2+5+10+30 perc). Közben a keletkező termék miatti sárga szín fokozatosan eltűnt, tehát a reakció befejeződött. A reakcióelegyet 10% DIEA/DCM eleggyel semlegesítettem (4x1 perc), majd DCM-es mosás után a β-amiloid szekvenciával folytattam a szintézist, és a gyantakapacitásnak megfelelő 12 ekvivalens mennyiséggel dolgoztam.

5. táblázat A szintézis során használt aminosav-származékok és kapcsolószerek

Aminosav-származékok	Moláris tömeg / g/mol	Szükséges mennyiség / g
Fmoc-Gly-OH	297,31	0,175
Fmoc-Lys(Mtt)-OH	624,79	0,367
Fmoc-Pro-OH	337,38	0,198
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,55	0,276
Fmoc-Thr(^t Bu)-OH	397,47	0,234
Fmoc-Gly-OH	297,31	0,700
Fmoc-Val-OH	339,39	0,799
Fmoc-Met-OH	371,45	0,874
Fmoc-Leu-OH	353,41	0,832
Fmoc-Ile-OH	353,41	0,832
Fmoc-Ala-OH	311,33	0,733
Kapcsolószerek	Moláris tömeg / g/mol	Szükséges mennyiség
HOBt (12% H ₂ O)	153,13	0,090 g
DIC	126,20	91 μl
HOBt (12% H ₂ O)	153,13	0,360 g
DIC	126,20	365 μl

A vastag vonal feletti adatok az oligotuftsin rész, míg az alatta levő adatok az építő peptidláncok kialakításához szükséges mennyiségeket mutatják.

A szekvencia felépítése után a gyantát két részre osztottam, majd az egyik feléről (0,2 g gyanta) a peptidet 10 ml TFA + 0,5 ml víz elegyével, 0,5 ml tioanizol, 0,25 ml EDT és 0,75 g fenol mellett lehasítottam. 15 perc jeges hűtés után még 1,5 órát kevertettem

szobahőmérsékleten, majd a peptidet jeges éterbe szűrtem, és centrifugálás után még háromszor éterrel mostam. A nyers peptidet 100%-os ecetsavban oldva liofilizáltam.

A kapott nyers termék tömege: 241 mg

Termelés: 48,0 %

A nyers peptidet RP-HPLC-vel, félpreparatív oszlopon tisztítottam. A tisztítást az 5.1.1 fejezetben leírt rendszeren és eluensekkel végeztem.

A tisztítás során gradiens elúciót használtam, az áramlási sebesség 4 ml / perc volt:

0. perc	45 % B
5. perc	45 % B
50. perc	95 % B

A tisztítási veszteség: 42%.

5.1.4 Ac-[Thr-Lys-Pro-Lys(H-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly)-Gly]₄-NH₂ (Ac-OT20-[Aβ(21-37)]₄-NH₂) előállítás, tisztítása, analízise

A gyanta másik felén folytattam az Aβ(21-37) epitóp kiépítését. A peptid lizin oldalláncát Boc, a szerin hidroxilcsoportját ^tBu, az aszparaginsav és glutaminsav ^oCOOH funkciós csoportját O^tBu, míg az aszparagin oldallánc funkciós csoportját Trt védőcsoport védte.

A hosszabb epitóp felépítése után lehasítottam az elágazások N-terminális alaninjairól is az Fmoc-csoportot, majd a peptidet a gyantáról szintén 10 ml trifluor-ecetsav és 0,5 ml víz elegyével, 0,75 g fenol, 0,5 ml tioanizol és 0,25 ml 1,2-etánditiol mellett hasítottam. A reakció 15 percig jeges hűtés után még 1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten zajlott. Az elegyet hűtött éterbe szűrtem, majd a kicsapódott peptidet centrifugáltam, és háromszor éterrel mostam. A peptidet 100%-os ecetsavban oldva liofilizáltam.

6. táblázat A szintézis során használt aminosav-származékok és kapcsolószerek mennyisége

Aminosav-származékok	Moláris tömeg / g/mol	Szükséges mennyiség / g
Fmoc-Gly-OH	297,31	0,350
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,55	0,552
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,67	0,702
Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	383,44	0,451
Fmoc-Val-OH	339,39	0,400
Fmoc-Asp(O ^t Bu)-OH	411,45	0,484
Fmoc-Glu(O ^t Bu)-OH	425,47	0,501
Fmoc-Ala-OH	311,33	0,366
Kapcsolószerek	Moláris tömeg / g/mol	Szükséges mennyiség
HOBt (12% H ₂ O)	153,13	0,180 g
DIC	126,20	182 µl

A nyers peptidet RP-HPLC-vel, félpreparatív oszlopon tisztítottam. A tisztítást az 5.1.1 fejezetben leírt rendszeren és eluensekkel végeztem.

A peptidet HFIP-ben oldottam, majd A eluenssel hígítottam tisztítás előtt. A konjugátum 88 aminosavból áll, ezért az oszlop nem volt képes teljesen elválasztani a különböző, hiányos szekvenciát tartalmazó anyagokat. A kapott frakció még további tisztításra szorul.

A tisztítás során gradiens elúciót használtam, az áramlási sebesség 4 ml / perc volt:

0. perc	45 % B
5. perc	45 % B
50. perc	95 % B

5.2 Biológiai vizsgálatok: a szintetizált biokonjugátumok antigén tulajdonságainak vizsgálata ELISA módszerrel

Az általam szintetizált biokonjugátumok immuno-analitikai vizsgálatát ELISA módszerrel végezték. A mérés során kereskedelmileg is elérhető humán szérum immunglobulin (IgG) készítményt (ivIgG, Calbiochem) alkalmaztak, amely tartalmazza a β -amiloid autoantitesteket, a következő protokoll szerint:

1. A 96 lyukú mikrotitrációs lemezt érzékenyítették 100 μ l/lyuk biokonjugátum oldattal ($c = 1\mu$ M PBS pufferben oldva, $pH = 7,4$), majd egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten inkubálták.
2. A lemezt négyszer mosták 200 μ l/lyuk mosó pufferrel (PBS-T: 0,05% Tween-20 PBS pufferben oldva, $pH = 7,4$)
3. A nem specifikus kötőhelyeket szobahőmérsékleten két óra alatt 200 μ l/lyuk BSA tartalmú pufferrel (5% BSA, 0,1% Tween-20 PBS pufferben) blokkolták.
4. A lemezt ezután egyszer 200 μ l/lyuk PBS-T pufferrel mosták.
5. Az ELISA lemezhez 100 μ l/lyuk autoantitesteket tartalmazó humán immunglobulin készítményt adtak (Calbiochem, a törzsoldat koncentrációja 12 μ g/ μ l 5% BSA, 0,1% Tween-20 / PBS puffer), amely a törzsoldat 1:33.3 arányban való hígítása volt. Ebből még háromszoros sorozathígítást végeztek 5% BSA, 0,1% Tween-20 / PBS oldattal, majd a lemezt két órán keresztül szobahőmérsékleten inkubálták.
6. A nem specifikus ellenanyagokat 200 μ l/lyuk PBS-T oldattal mosták ki.
7. A lemezhez „második ellenanyagként” (a blokkoló pufferrel 1:5000 arányban hígított) peroxidáz enzimmel konjugált, humán ellenanyagot felismerő kecske IgG-t adtak, és egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubálták.
8. A mintákat háromszor 200 μ l/lyuk PBS-T oldattal, majd egyszer 200 μ l/lyuk 0,05M-os nátrium-foszfát-citrát pufferrel ($pH = 5$) mosták.
9. A foszfát-citrát pufferben oldott 100 μ l o-fenilén-diamin dihidrokloridot ($c = 1$ mg/ml), és 2 μ l 30%-os H_2O_2 / 10 ml puffer oldatot pipettáztak a lyukakba.
10. Az abszorbanciát 450 nm-en Wallac 1420 Victor² ELISA lemez leolvasóval határozták meg.

6 Összefoglalás

Feltételezések szerint a β -amiloid szerepet játszhat az Alzheimer-kór kialakulásában, ezért fontos molekuláris célpont az betegek kezelésében. Korábbi kísérletek során meghatározták az $A\beta$ -autoantitestek által felismert „plakk-védő” ($A\beta(21-37)$) epitópot. Ezek az antitestek gátolják az aggregátumok kialakulását, és specifikusan csak az oligomer β -amiloidokhoz kapcsolódnak. Ennek ismeretében immundiagnosztikára illetve immunterápiára alkalmas konjugátumok állíthatók elő.

Munkám során egy kis kapacitású polietilén-glikol alapú gyantán (Rink Amide ChemMatrix[®]) totálszintézissel előállítottam különböző hosszúságú oligotuftsin-hordozókat, melyekhez a β -amiloid egy rövidebb ($A\beta(30-37)$) és egy hosszabb ($A\beta(21-37)$) epitópját szintetizáltam. A kész biokonjugátumokat RP-HPLC-vel tisztítottam és tömegspektrometria segítségével azonosítottam. A biokonjugátumok autoantitest-kötő képességét indirekt ELISA módszerrel vizsgálta a német partner.

Az eredmények alapján megállapítottam, hogy az autoantitestek kötődésének kiváltásához szükséges a hosszabb tetrauftsin hordozó, illetve valószínűleg a teljes $A\beta(21-37)$ epitóp szekvencia. A korábbi kísérletekkel ellentétben a konjugátumok nem tartalmaztak pentaglicin spacer, így az ELISA eredményeket összehasonlítva kijelenthető, hogy a távtartó egység szükséges az antigén-antitest komplex megfelelő kialakításához.

A további munkám során olyan konjugátumok előállítását tervezzük ChemMatrix[®] gyantán totálszintézissel, melyekben az OT20 hordozóhoz kapcsolódó epitóp a C-terminálison egy pentaglicin távtartó egységgel vagy a natív szekvenciával van meghosszabbítva.

7 Irodalomjegyzék

- [1.] Szirmai Imre: Neurológia, **2006**, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest
- [2.] www.hazipatika.com
- [3.] www.geographic.hu
- [4.] Kopper László, Schaff Zsuzsa: Patológia, **2004**, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest
- [5.] Kang, J., Lemaire H. G., Unterbeck A., Salbaum J. M., Masters C. L., Grzeschik K. H., Multhaup G., Beyreuther K., Muller-Hill B., The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, **1987**, 325, 733-736.
- [6.] Hardy J., Selkoe D. J., The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **2002**, 297, 353-356.
- [7.] Selkoe D. J., Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol.*, **1994**, 53, 438-447.
- [8.] Turner P. R., O'Connor K., Tate W. P., Abraham W. C., Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol.*, **2003**, 70, 1-32.
- [9.] Wiltfang J., Esselmann H., Bibl M., Smirnov A., Otto M., Paul S., Schmidt B., Klafki H. W., Maler M., Dyrks T., Bienert M., Beyermann M., Ruther E., Kornhuber J., Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *J Neurochem.*, **2002**, 81, 481-496.
- [10.] Haass C., Schlossmacher M. G., Hung A. Y., Vigo-Pelfrey C., Mellon A., Ostaszewski B. L., Lieberburg I., Koo E. H., Schenk D., Teplow D. B., Selkoe D. J., Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, **1992**, 359, 322-325.
- [11.] Jarrett J. T., Berger E. P., Lansbury P. T. Jr., The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, **1993**, 32, 4693-4697.
- [12.] Younkin, S. G. The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris*, **1998**, 92, 289-292.
- [13.] Scheuner D., Eckman C., Jensen M., Song X., Citron M., Suzuki N., Bird T. D., Hardy J., Hutton M., Kukull W., Larson E., Levy-Lahad E., Viitanen M., Peskind E., Poorkaj P., Schellenberg G., Tanzi R., Wasco W., Lannfelt L., Selkoe D., Younkin S., Secreted

- amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med.*, **1996**, 2, 864-870.
- [14.] Soto C., Sigurdsson E. M., Morelli L., Kumar R. A., Castano E. M., Frangione B., Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med.*, **1998**, 4, 822-826.
- [15.] Citron M., Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. *Nat Neurosci.*, **2002**, 5 Suppl, 1055-1057.
- [16.] Pangalos M. N., Jacobsen S. J., Reinhart P. H., Disease modifying strategies for the treatment of Alzheimer's disease targeted at modulating levels of the beta-amyloid peptide. *Biochem Soc Trans.*, **2005**, 33, 553-558.
- [17.] Bard F., Cannon C., Barbour R., Burke R. L., Games D., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Lieberburg I., Motter R., Nguyen M., Soriano F., Vasquez N., Weiss K., Welch B., Seubert P., Schenk D., Yednock T., Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med.*, **2000**, 6, 916-919.
- [18.] DeMattos R. B., Bales K. R., Cummins D. J., Dodart J. C., Paul S. M., Holtzman D. M., Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **2001**, 98, 88.
- [19.] Dodart J. C., Bales K. R., Gannon K. S., Greene S. J., DeMattos R. B., Mathis C., DeLong C. A., Wu S., Wu X., Holtzman D. M., Paul S. M., Immunization reverses memory deficits without reducing brain A beta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci.*, **2002**, 5, 452-457.
- [20.] Mező G., Kalászi A., Reményi J., Majer Zs., Hilbert Á., Láng O., Köhidai L., Barna K., Gaál D., Hudecz F., Synthesis, conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsin-like sequence. *Biopolymers*, **2004**, 73, 645-656.
- [21.] McLaurin J., Cecal R., Kierstead M. E., Tian X., Phinney A. L., Manea M., French J. E., Lambermon M. H., Darabie A. A., Brown M. E., Janus C., Chishti M., Horne P., Westaway D., Fraser P. E., Mount H. T., Przybylski M., St George Hyslop P., Therapeutically effective antibodies against amyloid- β peptide target amyloid- β residues 4–10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nature Med.*, **2002**, 8, 1263-1269.

- [22.] Mező G, Láng O, Jakab A, Bai KB, Szabó I, Schlosser G, Láng J, Kóhidai L, Hudecz F., Synthesis of oligotuftsin-based branched oligopeptide conjugates for chemotactic drug targeting. *J. Pept. Sci.*, **2006**, 12, 328-336.
- [23.] Merrifield B., Life During a Golden Age of Peptide Chemistry. **1993**, (J. I. Seeman, Ed.) ACS, Washington, D.C.
- [24.] Grant A.G., Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis, Synthetic Peptides a User's Guide. Oxford, *University Press*, **1992**, 88-96.
- [25.] König W., Geiger R., Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid und 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin. *Chem. Ber.*, **1970**, 103, 788-798.
- [26.] Camperi S.A., Marani M.M., Iannucci N.B., Côté S., Albericio F., Cascone O., An efficient strategy for the preparation of one-bead-one-peptide libraries on a new biocompatible solid support. *Tetrahedron Letters*, **2005**, 46, 1561-1564.
- [27.] García-Martín F., Quintanar-Audelo M., García-Ramos Y., Cruz L.J., Gravel C., Furic R., Côté S., Tulla-Puche J., Albericio F., ChemMatrix, a Poly(ethylene glycol)-Based Support for the Solid-Phase Synthesis of Complex Peptides. *J. Comb. Chem.*, **2006**, 8, 213-220.
- [28.] García-Ramos Y., Paradís-Bas M., Tulla-Puche J., Albericio F., ChemMatrix[®] for complex peptides and combinatorial chemistry. *J. Pept. Sci.*, **2010** (online)
- [29.] Barany G., Merrifield R.B., The Peptides. (Gross and J. Meienhofen, Eds.), *Academic Press*, **1979**, 2, 1-284.
- [30.] Carpino L.A., Han G.Y., The fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem.*, **1972**, 37, 3404-3409.
- [31.] Barany G., Kneib-Cordonier N., Mullen D.G., Solid-phase peptide synthesis: a silver anniversary report. *Int.J.Pept.Prot.Res.*, **1987**, 30, 705-739.
- [32.] Fields G.B., Tian Z., Barany, G., Synthetic peptides. Ed: Grant, G. A. Freeman, and Co, New York, **1992**, 77-183.
- [33.] Newcomb R., Szoke B., Palma A., Wang G., Chen X., Hopkins W., Cong R., Miller J., Urge L., Tarczy-Hornoch K., Loo J.A., Dooley D.J., Nadasdi L., Tsien R.W., Lemos J., Miljanich G., Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry*, **1998**, 37, 15353-15362.
- [34.] Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.*, **1970**, 34, 595-598.

- [35.] Kaiser E., Bossinger C. D., Colescott R. L., Olsen D.B., Color test for terminal prolyl residues in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytica Chimica Acta*, **1980**, 118 (1), 149-151.
- [36.] Engvall E., Perlmann P., Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.*, **1972**, 109, 129-135.

8 Ábrajegyzék

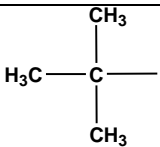
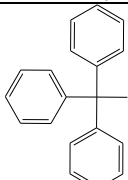
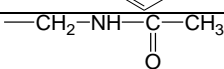
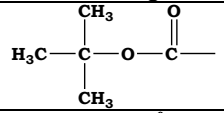
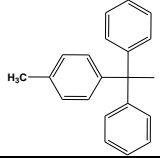
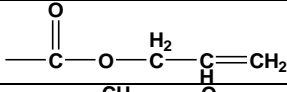
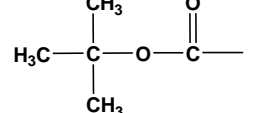
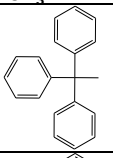
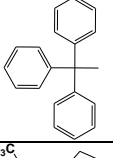
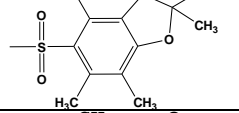
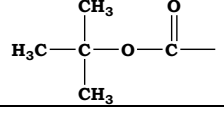
- 1. ábra** Alzheimer-kóros betegek becsült száma a következő évtizedekben az Egyesült Államokban
(FORRÁS: <http://www.alzalliance.org/aboutalz.htm>)
- 2. ábra** Egy egészséges és egy Alzheimer-kóros agy összehasonlítása
(FORRÁS: http://www.healthline.com/galeimage?contentId=gegd_0002_0001_0_00032&id=gegd_0002_0001_0_img0019)
- 3. ábra** Degenerált idegnyúlványok
(FORRÁS: <http://freshoutsidehealthyinside.wordpress.com/>)
- 4. ábra:** Amiloid plakk
(FORRÁS: <http://www.pharma.uzh.ch/research/neuromorphology/researchareas/neurodegeneration/introduction.html>)
- 5. ábra:** Az APP enzimatisz hasadásának lehetséges útvonalai
(FORRÁS: Marilena Manea doktori disszertációja (2006))
- 7. ábra:** Rink Amide ChemMatrix[®] gyanta
(FORRÁS: S. A. Camperi et al., *Tetrahedron Letters*, **2005**, 46, 1561-1564 és http://www.pcasbiomatrix.com/rink_amide_chemMatrix.html)
- 11. ábra:** Indirekt ELISA
(FORRÁS: <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/Az%20AIDS%20diagnosztik%C3%A1ja%20%C3%A9s%20kezel%C3%A9seGKj.pdf>)

9 Rövidítésjegyzék

AB	β -amiloid
Ac	acetyl
Ac ₂ O	ecetsavanhidrid
APP	amiloid perkurzor protein
BHA	benzhidrilamin
Boc	<i>tert</i> -butiloxikarbonil
BOP	benztriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)-foszfónium hexafluoro-foszfát
BSA	marha szérum albumin
^t Bu	<i>tert</i> -butil
Bzl	benzil
DBU	1,8-diazobicyclo[5.4.0]undek-7-én
DCC	<i>N,N'</i> -diciklohexil-karbodiimid
DCM	diklórmétán
DCU	<i>N,N'</i> -diciklohexil-urea
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropil-karbodiimid
DIEA	<i>N,N'</i> -diizopropil- <i>N</i> -etilamin
DIU	<i>N,N'</i> -diizopropil-urea
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamid
DTT	1,4-DL-ditiotreitol
EDT	1,2-etándiol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (enzim-kötött immunvizsgálat)
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
Fmoc	9-fluorenilmetoxikarbonil
HF	hidrogén-fluorid
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-izopropanol
HOBt	1-hidroxi-benztriazol
HPLC	nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia
IgG	immunglobulin G
MBHA	4-metil-benzhidrilamin
MS	tömegspektrometria
O ^t Bu	<i>tert</i> -butilészter
PAM	4-hidroximetil-fenilacetamidometil
PBS	sós foszfát puffer
RP-HPLC	fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia
SPPS	szilárdfázisú peptidszintézis
OT10	dituftsinn
OT20	tetratuftsinn
TIS	triizopropil-szilán
TFA	trifluorecetsav
TFMSA	trifluormetánszulfonsav
TMSOTf	trimetilszilil-trifluormetánszulfonát
Trt	tritol
Ttds	1,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin-szukcinát

10 Függelék

7. táblázat Fmoc/tBu stratégia oldallánc védőcsoportjai

Funkciós csoportok	Aminosav	Védőcsoport	
-OH	szerin, treonin, tirozin	 $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_2$	<i>tert</i> -butil (tBu)
-SH	cisztein		tritol (Trt)
		 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$	acetamidometil (Acm)
-εNH ₂	lizin	 $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$	<i>tert</i> -butiloxikarbonil (Boc)
			4-metil-tritol (Mtt)
		 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$	alliloxikarbonil (Alloc)
-αCOOH	aszparaginsav, glutaminsav	 $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$	<i>tert</i> -butil-észter (O ^t Bu)
-αCONH ₂	aszparagin, glutamin		tritol (Trt)
-imidazol	hisztidin		tritol (Trt)
-guanidino	arginin		2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-6-szulfonil (Pbf)
-indol	triptofán	 $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$	<i>tert</i> -butiloxikarbonil

8. táblázat Boc/Bzl stratégia oldallánc védőcsoportjai

Funkciós csoportok	Aminosav	Védőcsoport	
-OH	szerin, treonin		benzil (Bzl)
	tirozin		2-brómbenziloxikarbonil (2-Br-Z)
			2,6-diklór-benzil (2,6-di-Cl-Bzl)
			ciklohexil (cHex)
-SH	cisztein		4-metil-benzil (Meb)
			4-metoxi-benzil (Mob)
			acetamidometil (Acm)
- ^ε NH ₂	lizin		benziloxikarbonil (Z)
			2-klór-benziloxikarbonil (2-ClZ)
- ^ω COOH	aszparaginsav, glutaminsav		benzil-észter (OBzl)
			ciklohexil-észter (OcHex)
- ^ω CONH ₂	aszparagin, glutamin		xantil (Xan)
-imidazol	hisztidin		tozil (Tos)
			dinitrofenil (Dnp)
			benziloximetil (Bom)
-guanidino	arginin		tozil (Tos)
			2,3,6-trimetil-benzolszulfonil (Mts)
			4-metoxi-2,3,6-trimetil-benzolszulfonil (Mtr)
-indol	triptofán		formil (For)
			ciklohexiloxikarbonil (Hoc)
-szulfid	metionin		oxidálás, szulfoxid