

XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia

— Kémiai és Vegyipari Szekció —

PAPP DÓRA

Vegyész MSc, I. évfolyam

Amiloid szerkezetek stabilitásvizsgálata fehérjékben

Témavezetők:

Dr. Perczel András

egyetemi tanár

Dr. Pohl Gábor

tudományos segédmunkatárs

ELTE Szerves Kémiai Tanszék

2012



E ö t v ö s L o r á n d
Tudományegyetem
Természettudományi Kar

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	2
1. Bevezetés	3
2. Irodalmi előzmények	4
2.1. A fehérje-aggregáció problémája, az amiloid szálak szerkezete	4
2.2. Az aggregáció hajtóerejének elméleti kémiai vizsgálata	5
3. Célkitűzések	7
4. Alkalmazott módszerek	8
4.1. Kvantumkémiai áttekintés	8
4.2. A megfelelő elméleti szint kiválasztása	9
4.3. Az NBO analízis elméleti háttere	10
5. Számítási részletek	13
5.1. Modellszerkezetek	13
5.2. Az alkalmazott elméleti szint	14
5.3. Stabilitásvizsgálat és rezgési analízis	15
5.4. NBO analízis	17
6. Eredmények és következtetések	18
6.1. Oligopeptidek dimerizációja	18
6.1.1. <i>Termodinamikai függvények változása a dimerizáció során</i>	18
6.1.2. <i>Antiparallel dimer β-redős szerkezetek rezgési analízise</i>	20
6.1.3. <i>A dimerizáció általános jellemzése</i>	22
6.2. Peptidszálak oligomerizációjának vizsgálata	23
6.2.1. <i>Monoalanin oligomerek parallel és antiparallel szerkezeteinek összehasonlítása</i>	23
6.2.2. <i>Antiparallel mono- és dialanin oligomerek stabilitásának összevetése</i>	25
6.3. Antiparallel redők építőköveinek NBO analízise	26
6.3.1. <i>Az analízis menete</i>	26
6.3.2. <i>A 10 és 14 tagú gyűrűk stabilizációja</i>	28
6.4. β -redős szerkezetek stabilitása oldószerben	30
6.5. Stabilitás jóslása, konformációs entrópia	31
7. Összefoglalás	34
8. Köszönetnyilvánítás	35
9. Irodalomjegyzék	36

Rövidítésjegyzék

BSSE	Basis Set Superposition Error, bázisátfedésből adódó hiba
CI-sorfejtés	Configurational Interaction sorfejtés
CC-módszer	Coupled Cluster módszer
DFT	Density Functional Theory, Sűrűségfunkcionál elmélet
DZP bázis	Double Zeta Polarizált bázis
HF-módszer	Hartree-Fock módszer
IEFPCM	Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model
MO	Molecular Orbital, molekulapálya
MP n -módszerek	Moller-Plesset perturbációs módszer (n a perturbáció rendje)
NAO	Natural Atomic Orbital, természetes atompálya
NBO	Natural Bond Orbital, természetes kötőpálya
NHO	Natural Hybrid Orbital, természetes hibridpálya
NLMO	Natural Localized Molecular Orbital, természetes lokalizált molekulapálya
NMB	Natural Minimal Basis, természetes minimális bázis
NO	Natural Orbital, természetes pálya
NRB	Natural Rydberg Basis
PES	Potential Energy Surface, Potenciális energia felület
PNAO	Pre-ortogonal Natural Atomic Orbital, pre-ortogonális természetes atompálya
PNBO	Pre-ortogonal Natural Bond Orbital, pre-ortogonális természetes kötő pálya
PNHO	Pre-ortogonal Natural Hybrid Orbital, pre-ortogonális természetes hibrid pálya
TZP bázis	Triple Zeta Polarizált bázis
SCF eljárás	Self Consistent Field eljárás
ZPE	Zero Point Energy, zéruspont energia

1. Bevezetés

A számítástechnika rohamos fejlődésének köszönhetően napjainkban a kémián belül egyre szélesebb körben használatosak a kvantumkémia módszerei, amelyek hatalmas számításigényük miatt alapvetően a számítógépekre kénytelenek támaszkodni. E módszerek ma már kis- és nagymolekulák, esetleg több molekulából álló, nagyobb rendszerek modellezésére és tervezésére is lehetőséget kínálnak. Ezt használja fel például a gyógyszeripar gyógyszerhordozó molekulák megtervezésekor, a szintetikus szerves kémia lehetséges új reakcióutak keresése során, illetve a spektroszkópia a különböző spektrumok értelmezésekor, vagy pedig a fémorganikus kémia a katalizátorok viselkedésének magyarázatához. Fontos, mivel a kémia alapvetően kísérleti tudományág, hogy ezen eljárások alkalmazása csakis a kísérleti eredményekkel összhangban, azok kiegészítésére, illetve magyarázatára, esetleg jóslására, szelektálására alkalmasak – erre viszont kitűnően. A számításos kémia ezen ágának egyre elterjedtebbé válásával sok, eddig egyáltalán nem, vagy ritkán használt vizsgálati módszer vált általánossá, széleskörűen elérhetővé.

A számításos kémia a különböző analitikai (diffrakciós: pl. Röntgen, vagy spektroszkópiái: pl. NMR), valamint szintetikus kémiai módszerekkel és technikákkal együtt igen eredményesnek bizonyulhat bonyolult kémiai folyamatok leírásában, illetve tervezésében. Különösen fehérjék szerkezetének és dinamikájának tanulmányozása során hasznos e módszerek ötvözése. Jelen munkában a kvantumkémiai megközelítést helyeztük előtérbe, ennek segítségével próbálva magyarázatot adni a szervezetben gyakran előforduló fehérje aggregációs jelenségekre. E folyamatok fontos szerepet játszanak különféle betegségek, mint például az Alzheimer-kór kialakulásában is. Munkánk célja volt, hogy a szervezetben létrejövő amiloid-szerű aggregátumok szerkezetének modellezésével felderítsük azok kialakulásának hajtóerejét, és ez alapján értelmezzük stabilitásukat. Az aggregátumokban megjelenő β -redős szerkezetek modelljeinek részletesebb termokémiai vizsgálata lehetővé teszi nagyobb rendszerek tulajdonságainak becslését is, ezzel biztosítva jelen módszernek a gyakorlatba történő átültethetőségét.

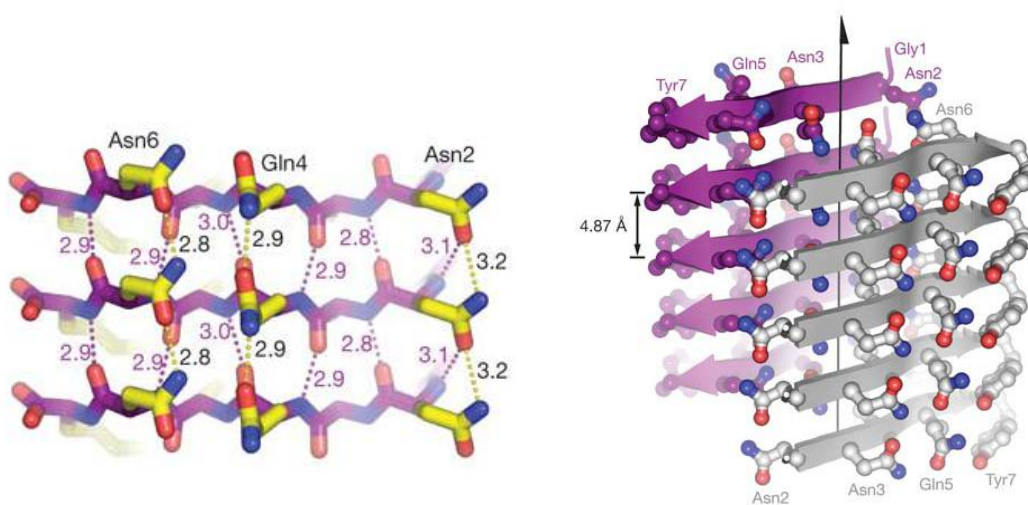
Kimutatták¹, hogy a fehérjék amiloid jellegű szerkezetbe történő átalakulása gyakorlatilag független azok szekvenciájától, ennek megfelelően oligoalanin modellrendszerek segítségével a fehérjék amidgerincének β -redős szerkezetté történő összekapcsolódását tanulmányoztuk munkánk² során.

2. Irodalmi előzmények

2.1. A fehérje-aggregáció problémája, az amiloid szálak szerkezete

Az elmúlt évtizedekben számos betegségről, mint például az Alzheimer-kór, a Creutzfeld-Jacob kór, illetve a II-es típusú cukorbetegség, megállapították³, hogy a természetes konformációjukat elvesztett fehérjék aggregációja során kialakuló, makroszkópikus méretű lerakódások, ún. plakkok állnak ezek háttérben. A sejten belül már a természetestől enyhén eltérő körülmények között is megváltozhat a fehérjék konformációja, és a natív szerkezet helyett egy nyújtott, elágazásmentes szálakból álló, ún. amiloid-szerű szerkezetté állnak össze. Az amiloid elnevezést azokra az aggregátumokra használják, amelyek a sejten kívüli lerakódásokban találhatók, és specifikusan megkötik a kongóvörös festéket. Biofizikusok az „amiloid-szerű” elnevezést egy jellemző „kereszt- β ” Röntgen-diffrakciós mintázat megjelenéséhez kötik, sejten belüli aggregátumok esetén is⁴.

Kimutatták, hogy a fent említett, az amiloidra jellemző kereszt- β mintázathoz egy tipikus kereszt- β -gerinc konformáció tartozik, amelynek atomi felbontású szerkezetvizsgálatára jelentős erőfeszítések történtek - sikerrel^{5,6}. A kereszt- β -gerinc ismétlődő β -redő párok összessége, amelyek párhuzamosak az amiloid fonal tengelyével, a redőt alkotó fehérje szálak pedig merőlegesek erre a tengelyre. A párokban az egyes redők egy ún. „térbeli cipzárhoz” hasonló szerkezetben kapcsolódnak egymáshoz, amelynek több fajtája is ismert⁵.



1. ábra: kereszt- β -gerinc szerkezetek (a hosszúság adatok Angström egységben értendők)⁵

Az amiloid szálakon belül hármasszintű szerveződés figyelhető meg a szerkezeti elemek között: először a különböző fehérje-gerinc részletek erős H-kötés rendszert kialakítva β -redővé állnak össze, majd ezek komplementer párokat képeznek egy-egy további β -redővel (a térbeli-cipzár mintázatot követve), végül pedig a β -redő párok egymással kölcsönhatva létrehozzák az amiloid szálak szerkezetét⁵.

Az amiloid szerkezetek képződését vizsgálva azt találták, hogy az aggregátumok kialakulása ún. nukleációs mechanizmussal írható le, először képződik a natív konformációjukat elvesztett fehérjéből egy β -redős szerkezetű álló mag, és ehhez tapad hozzá a többi redős fehérje-részlet⁶. Az aggregátum, bár képződése reverzibilis folyamat, ha egyszer kialakult, igen stabil, nehezen alakítható vissza a kiindulási állapotába. Az aggregációs folyamatot számos fehérjében megfigyelték, és kimutatták, hogy az gyakorlatilag a fehérjék hosszától és eredeti szekvenciájától függetlenül bekövetkezik¹.

2.2. Az aggregáció hajtóerejének elméleti kémiai vizsgálata

Perczel és munkatársai⁷ a témához kapcsolódó kísérleti adatok magyarázatára elméleti számításokat végeztek, az amiloid szerkezetté történő összeállás hajtóerejének feltárása érdekében. Kihasnálva, hogy az aggregáció tulajdonképpen a fehérjék primer szekvenciájától független, tehát valószínűleg a fehérje gerincéhez köthető folyamat, illetve hogy általában rövidebb molekularészletek alkotják a kezdeti redős szerkezeteket, kis, glicinből és alaninból álló modellpeptideken kvantumkémiai számításokat végeztek. Az alapvetően termodinamikai megközelítésből (*ab initio* számított ΔE és ΔG adatok) egyértelműen az adódott, hogy a számos lehetséges másodlagos szerkezet közül, amelyeket egy polipeptid lánc felvehet, a β -redős szerkezetek a legstabilabbak, mind oldatban, mind pedig kristályos állapotban. Mind az aminosavak hozzáadásával, mind a redőt alkotó szálak számának növekedésével csökken az energia az aggregátumok képződése során, ezzel magyarázható a kialakult aggregátumok rendkívüli stabilitása. A β -redős szerkezet preferenciája úgy tűnik, hogy a fehérje gerinc egy általános tulajdonsága, magyarázatul szolgálva arra a tényre, hogy az eddigi megfigyelések alapján az aggregáció a primer szekvencia szintjén nem kódolt.

Egy másik jelentős aspektusa az amiloid szerkezet kialakulásának elméleti vizsgálatában az entrópia szerepének megértése. A polipeptidek egyensúlyi dimerizációs (majd oligomerizációs) folyamatait tekintve az entalpiaváltozás a következő, megszokott felbontásban írható:

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S \quad (1)$$

ahol a ΔG a folyamat hajtóerejének, ΔS pedig a folyamat során a változó rendezetlenség mértékén leírására szolgáló mennyiség. N- és C-védett glicin molekulákra kimutatták⁸, hogy az entrópia csökkenése információ felhalmozódást von maga után, míg az entrópia növekedése információvesztést eredményez. Így az entrópia a folyamatra jellemző szerkezeti információ megváltozásának arányát (I/I_0) tükrözi, illetve hasonlóan, az 1 állapotból a 2 állapotba haladó folyamat megnövekedett vagy lecsökkent komplexitása is az entrópiához kapcsolható:

$$\text{Komplexitás} = RT \ln(I/I_0) = -T\Delta S[1 \rightarrow 2] \quad (2)$$

Egy termodinamikai rendszer teljes entrópiája két részre bontható. A konformációs (külső, angolul: extrinsic) entrópia a fehérjék lehetséges konformációs állapotainak számából becsülhető⁹, és mint ilyen, a feltekeredési folyamat jellemzéséhez nyújthat segítséget^{10,11,12}. Minthogy egy feltekeredett fehérje jól definiált szerkezettel rendelkezik, ennek az entrópiája, a belső (angolul: intrinsic) entrópia ugyancsak megbecsülhető, és az adott konformer stabilitásáról nyújt értékes információkat¹³. Kvantumkémiail módszerekkel rezgési analízist végezve már számos alkalommal sikerült a fehérjék másodlagos szerkezetének képződését és stabilitását modellezni¹⁴.

Az elméleti jellegű számítások egy újabb fontos mozzanata a képződött szerkezetek stabilitásának megértése, visszavezetve azokat a rendszer hullámfüggvényének tulajdonságaira. Erre kiváló lehetőséget nyújt az ún. NBO (Natural Bond Orbital) analízis^{15, 16}, amely a hullámfüggvényből képzett elsőrendű redukált sűrűségoperátor sajátfüggvényeinek meghatározásán alapul. Az ezzel a módszerrel nyert, a klasszikus Lewis-képhez igen közel álló ún. természetes pályák betöltöttségéből, illetve átfedéséből megállapítható, hogy pontosan mely molekulapályák interakciójaként áll elő egy-egy stabilizáló kölcsönhatás, melyek és milyen jellegűek azok a kötések, amik összetartják az adott konformert.

Ezt az eljárást már eddig is többször alkalmazták sikerrel fehérjék szerkezetének, az őket összetartó, a feltekeredésükben szerepet játszó kölcsönhatások azonosítására, súlyának becslésére. A feltekeredett fehérjékben eddig is köztudottan jelen levő H-kötések mellett az NBO analízis segítségével egy másfajta kölcsönhatást is kimutattak, amely egy oxigénatom delokalizált magányos elektronpárja és a szomszédos C=O kötés π^* lazító pályája között alakul ki¹⁷. Egy másik esetben szintén egy új, (sp^3 hibrid)C-H $\cdots$ S-Fe 3 centrumos – 4 elektronos fehérjékben előforduló kölcsönhatás létezését bizonyították e módszer segítségével¹⁸. Ezen kívül jelentős a szervetlen és a fémorganikus kémia^{19,20}, illetve a szerves kémia területén is az NBO analízis alkalmazása, például a reakciómechanizmusok feltárása, illetve a szintézisek tervezése során^{21,22}.

3. Célkitűzések

Mivel az amiloid szálakat alkotó β -redős szerkezetek képződése a primer szekvenciától nem mutat függést, valószínűsíthető, hogy az aggregáció hajtóerejének felderítéséhez a peptidek amid gerincének modellezése elegendő. A gerincrészek első dimerizációs, illetve a modellpeptid szálak oligomerizációs lépéseinek termodinamikáját tanulmányozva közelebb kerülhetünk a folyamatok hajtóerejének megértéséhez, ezáltal olyan körülmények felderítéséhez, amelyek az aggregációs folyamat leállításához vezethetnek.

A di- és oligomerizációs folyamatok termokémiájának, elsősorban entrópiaváltozásainak, illetve a kiindulási anyagok és a képződött aggregátumok rezgési módusainak kvantumkémiai úton történő vizsgálata volt célunk. Modell rendszerként alaninból felépített oligopeptideket használva a kialakuló β -redőzött rétegek számos tulajdonságára, főként pedig stabilitásuk mibenlétére adhatunk magyarázatot.

Munkánk célja volt a kvantumkémiai úton számított termodinamikai függvények változásainak nyomon követése oligopeptidek dimerizációja során az aminosavszám függvényében, mind parallel, mind antiparallel β -redő esetén, valamint az egy (megfelelő) egység hozzáadásakor a függvényértékekben fellépő relatív növekmények alapján kiterjedtebb rendszerek stabilitásának becslése. Antiparallel esetben mindhárom említett függvény értékei lépcsősen változnak, e jelenség okára is szerettünk volna magyarázatot adni, rezgési analízis segítségével. Ennek során a dimerekben megjelenő új rezgési módusok azonosítását kívántuk elvégezni a 10- és 14-tagú, antiparallel redőkben előforduló ún. H-kötésű pszeudogyűrűk esetében. Végül pedig a redőképződés növekedésének másik dimenzióját, a peptidszálak összekapcsolódását terveztük részletesebben vizsgálni, így ebben az irányban is jósolhatóvá tenni nagyobb rendszerek stabilitását. Dialaninszálak oligomerizációjának jellemzését ellenőrző számításként célunk volt elvégezni, eredményeink hitelességének biztosítása végett. Ezen kívül célunk volt a fent említett lépcsősséget okozó antiparallel H-kötésű gyűrűk eltérő stabilitásának megértése NBO analízis segítségével.

4. Alkalmazott módszerek

4.1. Kvantumkémiái áttekintés²³

Ahogy a bevezetésben is említettük, napjainkban a kémia területén egyre szélesebb körben alkalmazzák a kvantumkemiát, amely tágabb értelmezésben nem más, mint a kvantummechanika, mint fizikai modell alkalmazása kémiai rendszerekre. Két ága a magmozgás- illetve az elektronszerkezet-számítás, amely felosztást a Born-Oppenheimer közelítés teszi lehetővé, melyből a PES (potenciális energia felület), mint fogalom származik. Az elektronszerkezet számításának két leggyakrabban alkalmazott alapelve a variációs és a perturbációs módszer. Az előbbi lényege, hogy a variációs elv segítségével keressük az alapállapot energiáját (E_0), amelyről az elv értelmében tudjuk, hogy csak az egzakt hullámfüggvény esetén egyezik meg a variációs módon számolt energiaértékkel, egyébként a számított érték egy felső korlátja E_0 -nak. A perturbációs számítás alapja pedig annak feltételezése, hogy a vizsgálandó rendszerünk csak „kis mértékben” különbözik egy ismert rendszertől, így energiája számítható az ismert rendszer Hamilton-operátorának perturbálásával (egy korrekciós tag hozzáadásával); ám az előzővel ellentétben ez a módszer nem ad korlátot a számított energiára nem egzakt hullámfüggvény esetén.

Ahhoz, hogy molekulák elektronszerkezetét hatékonyan tudjuk számítani, pontosan meg kell határoznunk, hogy milyen elhanyagolásokat alkalmazunk és mindezt milyen mértékben tesszük, a számításigény optimalizálása végett. Ilyen például a rendszer Hamilton-operátorából a relativisztikus effektusok elhanyagolása, az elektronkorreláció figyelembe vételének módja, illetve a bázis típusa és mérete (adott elméleti szint), amelyen a keresett hullámfüggvényt sorba fejtjük. A legtöbb kémiai elem esetén a nemrelativisztikus közelítés teljes mértékben helytálló, az ebből adódó hiba nem számottevő. Az elektronkorreláció figyelembe vételére a Hartree-Fock (HF) módszer nem alkalmas, ám a poszt-HF módszerek számos különböző olyan eljárásan alapulnak, amelyek jól leírják az elektronok korrelációját. Ezt megvalósíthatjuk variációs (CI-sorfejtés), illetve perturbációs úton (MP_n -módszerek), de más módon is (CC, Coupled Cluster módszer). A bázisfüggvények kiválasztásának fő szempontja a minél gyorsabb konvergencia elérése az SCF-eljárás során. Általában úgy választjuk őket, hogy a molekula atomjain legyenek centráltak, úgy, hogy helyzetük tükrözze a molekula szimmetriáját, és főként Gauss-függvényeket alkalmazunk erre a célra. A szerkezet pontos leírása érdekében (akár beépített) polarizációs és diffúz

függvényeket is tartalmazhatnak, beszélhetünk ún. split-valence, vagy korreláció-konzisztens bázisokról is.

A kvantumkémiai számítások bonyolultságából következik, hogy elvégzésük számítógép nélkül elképzelhetetlen. Éppen ezért mára számos erre alkalmas programcsomagot kifejlesztettek, ezek közül is a legáltalánosabban használt a Gaussian. Ezek segítségével a megfelelő elméleti szint és bázis kiválasztását követően egyszerűen és hatékonyan végezhetünk pontos, a kísérleti eredményekkel összhangban álló számításokat.

4.2. A megfelelő elméleti szint kiválasztása

Sok elektronból álló rendszerek, például biomolekulák vizsgálata esetén nincs lehetőség az elérhető legjobb korrelációs módszer és legnagyobb bázis használatára, mert a befektetett idő a pontosságban nem térül meg. Olyan elméleti szint alkalmazása szükséges ilyen esetekben, amely nem túl költséges, viszont a kísérletekkel jól egyező eredményeket szolgáltat. Ilyen rendszerek tanulmányozása során a célunk általában valamilyen, a biológiai (esetleg orvosi) gyakorlatban jól felhasználható tendencia, illetve egy kvalitatív kép kialakítása, ehhez pedig nem szükséges a választott módszerből esetlegesen adódó kisebb eltérések figyelembe vétele.

Biológiai rendszerek vizsgálatára a fentiek alapján ideális választás a DFT (Density Functional Theory, Sűrűségfunkcionál-elmélet) – módszer. Ez a következő eljárás²³: az alapállapot elektronsűrűségének funkcionáljaként keressük az alapállapot energiáját, variációs úton. Az első Hohenberg-Kohn (Walter Kohn, Kémiai Nobel-díj, 1998.) tétel kimondja, hogy egy rendszer alapállapotú energiája meghatározható az elektronsűrűség ismeretében, tágabban értelmezve a rendszer egy mérhető A tulajdonsága az alapállapot elektronsűrűségének egyértelmű funkcionálja, $A = A[\rho]$. A sűrűség meghatározását a második Hohenberg-Kohn tétel teszi lehetővé, amely azt mondja ki, hogy létezik egy $E_{HK}[\rho]$ energiafunkcionál, amely variációs, azaz egy közelítő sűrűség ($\tilde{\rho}$) esetén

$$E[\tilde{\rho}] \geq E_0[\rho_0], \quad (3)$$

ahol E_0 az alapállapot energiája és ρ_0 az adott rendszer alapállapotának elektronsűrűsége. Ez alapján keressük az energiafunkcionál minimumát, a részecskeszám állandóságát előíró mellékfeltétel mellett. Ennek az energiafunkcionálnak nem minden összetevője tisztázott - sajnos az elektronok kicserélődéséből és korrelációjából származó tag nem írható le egzakt módon -, ezért szükség van kísérleti adatokra történő illesztésre a pontosság javítása érdekében, így pedig

egyre újabb és hatékonyabb funkcionálok jelennek meg az irodalomban. Természetesen biológiai rendszerek esetében a DFT-n belül is törekednünk kell a lehető legpontosabb, az adott rendszer tulajdonságait és kölcsönhatásait a lehető legjobban leíró módszer használatára, ezért is érdemes a különböző funkcionálok közül a számunkra legmegfelelőbbet kiválasztani. Más kvantumkémiai módszerekkel összevetve a DFT pontosságának és számítás-, tehát költségigényének kiemelkedően jó aránya teszi az egyik leggyakrabban alkalmazott eszközzé nagy rendszerek modellezésében, hátránya viszont, hogy a módszer hibája nem szisztematikus, tehát nem jósolható.

4.3. Az NBO analízis elméleti háttere

Az elektronsűrűség függvénye tökéletesen leírja az adott molekula töltéeloszlását, viszont kezelése meglehetősen bonyolult. Ezt egyszerűsíthetjük olyan módon, hogy a töltésfelhőt megpróbáljuk felosztani az egyes atomok között, ezáltal a molekulán belül egy-egy atomhoz parciális töltést rendelhetünk. Ennek egyik lehetséges megvalósítási módja a Mulliken-féle populációs analízis²⁴, amely az ún. átfedési populációt ($p_{\mu\mu}S_{\mu\mu}$, ahol $p_{\mu\mu}$ a sűrűségmátrix, $S_{\mu\mu}$ pedig az átfedési-integrál mátrixának diagonális eleme) konvenció szerint egyenlő arányban osztjuk fel a bázisfüggvények között.

Ennél egy jóval pontosabb és szemléletesebb módszer az elsőrendű redukált sűrűségoperátor sajátérték egyenletén alapuló Natural Bond Orbital analízis^{15,16}.

$$\mathbf{F}\varphi_i = p_k\varphi_i \quad (4)$$

A fenti egyenletben a p_k sajátérték jelöli a φ_i „sajátpálya” betöltöttségét. A sűrűségoperátor valójában a teljes N-elektronos, a $|\Psi|^2$ által megadott valószínűségi sűrűségeloszlásnak az egy-elektronos vetületét állítja elő (A $\mathbf{F}$ tulajdonképpen egy Hermitikus, egydimenziós projekciós operátor), így alkalmas a teljes hullámfüggvény egy-elektronos alrendszerének leírására. Emellett pedig, ahogy minden Hermitikus operátor sajátfüggvényrendszere, a természetes pályák (natural orbital, NO) is teljes ortonormált bázist alkotnak. Egy normált θ próbapálya betöltöttsége a sűrűségoperátor várható értékeként lesz számítható, és a kapott p_θ értékeket variálva (maximalizálva) megkaphatjuk a fenti egyenletben definiált φ_i pályákat és az azokhoz tartozó optimált p_k értékeket. A Pauli-féle kizárási elv biztosítja, hogy $0 \leq p_k \leq 2$. Adott Ψ esetén az előbbi egyenlet megoldása kis mértékben függ

csak az választott χ_μ bázisfüggvényektől, legyenek azok Gauss- vagy Slater-típusúak, vagy akár síkhullámok.

A Natural Bond Orbital analízis egy sor olyan transzformációt foglal magában, amelyek a kiválasztott báziskészlet χ_μ pályáiból előállítják a megfelelő lokalizált (NAO), hibrid (Natural Hybrid Orbital, NHO), majd kötő-pályákat (NBO), illetve a természetes lokalizált molekulapályákat (Natural Localized Molecular Orbital, NLMO).

$$\chi_\mu \rightarrow \text{NAO} \rightarrow \text{NHO} \rightarrow \text{NBO, NLMO}$$

A bázisfüggvények ezen kívül átalakíthatók még delokalizált természetes pályákká (NO), illetve kanonikus molekulapályákká (MO) is. Az egyes transzformációs lépésekben kapott pályák ortonormáltak és ugyanazt a teljes teret feszítik ki, amelyet a kiindulási bázisfüggvények rendszere, így ezek segítségével egzakt módon számíthatók a hullámfüggvény, tehát a rendszer tulajdonságai.

A természetes atompályák (NAO) 1 centrumon lokalizált pályák, amelyek az **A** atom „effektív” természetes pályáit jelölik a molekulán belül. Az NAO-k két fontos fizikai tulajdonságot is magukban foglalnak, amelyek megkülönböztetik őket más atompályáktól, valamint a kiindulási bázisfüggvényektől: az NAO-k térbeli kiterjedése a molekulán belül az effektív atomtöltéshez „igazított”, tehát pl. ha az **A** atom inkább kationos jellegű, akkor kompaktabbak, ha pedig anionos, akkor kiterjedtebb az alakjuk, valamint mutatják az igen fontos csomóponti tulajdonságokat is. Az atomok közötti ortogonalitás elhagyásával, megszerkeszthetjük az ún. pre-ortogonális természetes atompályákat (pre-orthogonal NAO, PNAO), amelyek más atomokon levő PNAO-kkal átfedhetnek, ez teszi lehetővé az NAO-k kölcsönhatások erősségének becslését. Az NAO-k betöltöttségük szerint egyértelműen sorba rendezhetők. Összhangban a klasszikus kémiai fogalmainkkal, valójában csak az atomtörzs, illetve a vegyérték NAO-k betöltöttsége számottevő, ellentétben a Rydberg-típusú extra-vegyérték (virtuális) NAO-kkal, amelyek a többi NAO-val együtt azonban kifestik a kiindulási bázis egész terét. Ezek után lehetővé válik a teljes NAO-tér redukciója egy ún. „természetes minimális bázissá” (NMB), amely a törzs-, illetve a vegyérték NAO-kat foglalja magában. Ez az elhanyagolás mindenképpen helyénvaló, hiszen a virtuális vegyérték-NAO-k (természetes Rydberg-bázis, NRB) nem játszanak jelentős szerepet az NBO-analízis során, és ezek elhagyása a számításigény csökkenését is maga után vonja. Az NMB-re való áttérés lehetősége az egyik legfontosabb jellemzője a természetes pályákon alapuló vizsgálatoknak.

A természetes kötőpályák (natural bond orbital, NBO) több-centrumon lokalizált pályák (több: általában 1 vagy 2, de ennél több is lehet), amelyek jó Lewis-féle leírást adnak a kémiai kötésről (nyílt héjú rendszer esetén pedig a különálló elektronokról). Ezek az ún. természetes hibridpályákból (Natural Hybrid Orbital, NHO) tevődnek össze:

$$\Omega_{AB} = a_A h_A + a_B h_B, \text{ ahol } h_A = \sum_k c_k \varphi_k^{(A)}, \quad (5)$$

ahol $a_A^2 + a_B^2 = 1$. Ezen együtthatók értékétől függően a kötő NBO jellege változhat kovalens ($a_A = a_B$), vagy pedig ionos ($a_A \gg a_B$) határok között. A pre-ortogonális PNHO-k ugyanezen c_k koefficiensekkel írhatók fel a PNAO-k lineáris kombinációjaként. Az NAO-khoz hasonlóan a NHO-k is ortonormált bázist alkotnak, amely kifeszíti a kiindulási bázis teljes terét. A törzs NBO-k jellemzően majdnem tiszta NAO-karakterrel rendelkeznek, a nemkötő (1 centrumon lokalizált magányos elektronpár) NBO-k mindegyike pedig egy normált NHO-val egyezik meg ($n_A = h_A$). Minden kötő vegyérték NHO-kból álló NBO-nak ortogonálisnak kell lenni a megfelelő lazító NBO-ra. A lazító pályák definíciója:

$$\Omega_{AB}^* = a_B h_A - a_A h_B \quad (6)$$

A Ω_{AB}^* -k jellemzően a legfontosabb nem-Lewis-típusú akceptor pályák, hozzájárulnak a molekulák közötti H-híd kötések kialakításához, és más szupramolekuláris donor-akceptor kölcsönhatásokhoz. A rendelkezésre álló Ω_{AB}^* -k alakjának és energiájának ismerete nélkülözhetetlen egy sor fontos „nem-kovalens” és delokalizációs jelenség megértéséhez, amelyek túlmutatnak a Lewis-szerkezet alkotta képen. A nem-Lewis típusú vegyérték NBO-kat kiegészítjük még egy Rydberg-típusú 1-centrumú NBO-kból álló pálya-készlettel, amelyekkel együtt kifeszítik az eredeti NBO bázis terét. Hasonlóan az extra-vegyérték NAO-khoz, amelyekből származnak, ezen NBO-k is jellemzően elhanyagolható betöltöttséggel rendelkeznek, ezért többnyire elhagyhatók. Így a szignifikáns betöltöttséggel rendelkező NBO-k száma leredukálódott az NMB méretére – a kémiai szemlélettel összhangban.

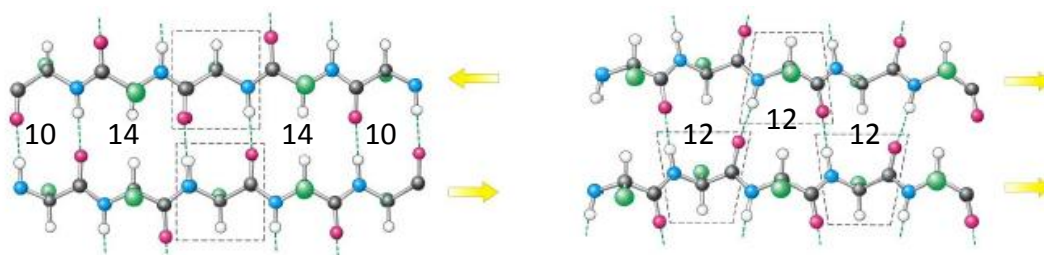
Mint ahogy az NAO-k esetében is, az NBO algoritmusnál is az egyetlen bemenő adat a rendszer hullámfüggvénye (a $\mathbf{F}$ operátoron keresztül), így azt mondhatjuk, hogy a numerikusan meghatározott Lewis-szerkezet a Ψ molekuláris hullámfüggvény „sajátja”.

5. Számítási részletek

5.1. Modellszerkezetek

Mivel a fehérjék aggregációs folyamatai a szekvenciától gyakorlatilag függetlenül végbemennek, megértésükhöz az amid gerinc modellezése elegendő^{1,7}, amelyet jelen munkában oligoalanin szálakkal helyettesítettünk. A gerincrészek dimerizációját, illetve oligomerizációját tekintjük az aggregáció kezdő lépéseinek⁷, így ezek termodinamikáját tanulmányozva közelebb kerülhetünk a folyamat hajtóerejének megértéséhez. Ezek alapján a fehérje gerinc aggregációs folyamatainak modellezésére a $\text{HCO}-(\text{Ala})_n-\text{NH}_2$, $[\text{HCO}-(\text{Ala})_n-\text{NH}_2]_2$ ($n=1-6$), $[\text{HCO}-\text{Ala}-\text{NH}_2]_m$ és $[\text{HCO}-(\text{Ala})_2-\text{NH}_2]_m$ ($m=2-6$) rendszereket használtunk.

A parallel és az antiparallel β -redők különböző H-kötési mintázattal rendelkeznek: a parallel redőben minden H-kötött „pseudogyűrű” 12 atomot tartalmaz, míg az antiparallel változatban a H-kötéses gyűrűket alkotó atomok száma 10 vagy 14 lehet.



2. ábra: 10- és 14-tagú H-kötésű gyűrűk az antiparallel (balra), valamint 12-tagúak a parallel (jobbra) β -redőben (a sárga nyilak az egyes peptidszálak irányultságát jelzik az N-terminális felől a C-terminálisig)

Dimerizáció során a páratlan számú alanin egységet tartalmazó szálak, oligomerizáció során pedig a páros számú monoalanint tartalmazó rendszerek esetében kétféle antiparallel szerkezetet képződését is figyelembe kellett vennünk, minthogy páratlan számú 10- illetve 14-tagú H-kötéses gyűrűket tartalmaznak. Amelyekben a 10-tagú gyűrűk száma volt több *s10*, amelyek pedig a 14-es tagszámú gyűrűből tartalmaztak többet, azokat *s14* rövidítéssel jelöltük. Ebből következik, hogy oligoalaninok parallel dimerjeinek csak egyféle, míg az antiparallel dimerjeinek kétféle szerkezete lehet, valamint a monoalanin páros „szálat” tartalmazó oligomerjeinek ugyancsak kétféle, míg a páratlan számúaknak csak egyféle elrendezése létezik. Az „ellenőrző” számítás alanyául szolgáló dialanin oligomereknek adott szálszám esetén csupán egyfajta felépítésük lehet, mert mivel páros

számú aminosav-monomert tartalmaznak, az egyes szálak között mindig kialakul egy 10- és egy 14-tagú pszeudogyűrű is.

5.1. Az alkalmazott elméleti szint

Biomolekulák modellezése során a legmeghatározóbb az azokat összetartó H-kötések és a diszperziós kölcsönhatások helyes leírása. E kölcsönhatások kezelése sajnos többnyire bonyolultnak adódik a DFT módszerekkel²⁵, mivel, amint azt fentebb említettük, a kicserélődési-korrelációs funkcionál csak nehézkesen, kísérleti eredményekre illesztett paraméterek beolvasztásával közelíthető. Ennek ellenére számos próbálkozás történt például a diszperziós erők pontosabb leírására szolgáló funkcionálok fejlesztésére, ilyen például a jelen dolgozatban is használt, Zhao és Truhlar által kifejlesztett M05-2X funkcionál²⁶. Számításainkat főként ezzel a funkcionállal végeztük, ám a dimerizációs jelenségek esetében kiegészítő számításokat végeztünk a manapság népszerű B3LYP funkcionállal²⁷ is, ám nem adódott jelentős különbség a kétféle módszerrel optimalt szerkezetek között.

Több peptid szálból álló molekulák modellezése során jelentős hibát okozhat az ún. *BSSSE*^{28,29} (Basis Set Superposition Error), a közeli bázisfüggvények átfedéséből adódó hiba. Az ebből következő stabilitásnövekedés figyelembe vétele az alábbiak szerint történt:

- Teljes szerkezetoptimalást és frekvenciaszámítást végeztünk az M05-2X/6-31G(d) elméleti szinten³⁰,
- ezt energiaszámítás követte az előbbi szinten optimalt szerkezeten az M05-2X/6-311G++(d,p) elméleti szinten,
- majd a M05-2X/6-311G++(d,p) szinten nyert energiaértékekkel korrigáltuk a DZP szinten kapott entalpia, és szabadentalpia értékeket.

Kimutatták, hogy az így korrigált értékek a bázisátfedési hibától csupán elhanyagolható mértékben terheltek³¹.

Főleg biológiai rendszerek modellezése esetén fontos, hogy eredményeinket alátámasszuk oldószerben végzett számításokkal, mivel e molekulák a valóságban az élő szervezetben, többnyire vizes közegben fordulnak elő. Ehhez a Gaussian programba beépített IEFPCM (Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model)³² kontinuum oldószermodellt alkalmaztuk. Feltételeztük, hogy az oldószer jelenléte nincs számottevő hatással a vákuumban nyert molekulaszervezetre, így a vizes közegben végzett számításaink során csupán „single point”

energiaszámítást végeztünk, és a következőképpen kezeltük az oldószer hatását a termokémiai paraméterekre:

- Teljes szerkezetoptimalást és frekvenciaszámítást végeztük vákuumban az M05-2X/6-31G(d) elméleti szinten,
- majd ezt energiaszámítás követte vizes közegben a vákuumban kapott optimált térszerkezeten, IEFPCM oldószer modellt alkalmazva, az M05-2X/6-311G++(d,p)// M05-2X/6-31G(d) elméleti szinten.

5.2. Stabilitásvizsgálat és rezgési analízis

A Gaussian programcsomagban a termokémiai adatok számítása statisztikus mechanikai összefüggések felhasználásával történik, a molekuláris rendszer különböző szabadsági fokaiból származtatott állapotösszegeknek a belső energia, az entrópia és hőkapacitás értékeihez való hozzájárulásának meghatározásával. Három fontos közelítést kell megemlítenünk, amelyeket a program használ: 1) a vizsgált részecskéket nem-kölcsönhatónak tekinti, az ideális gáz közelítést alkalmazva, 2) szintén e közelítésből kifolyólag, ahol szükséges, a PV szorzat helyett az RT értéket használja fel, az anyagmennyiséget 1 molnak véve, mivel a rendszer térfogatát nem ismerjük, 3) az első, és a további gerjesztett elektronállapotokba a rendszert átjárhatatlannak tekinti, a számítások elektron-alapállapotban történnek. A program a molekuláris állapotösszeg translációs, elektronikus, rotációs és vibrációs komponenseinek kiszámításával megállapítja azok hozzájárulását az S , U , és C_V értékekhez, majd ezeket összegezve kapjuk a megfelelő termodinamikai függvények (H és G) értékeit. Ezek változásából következtethetünk a modellezni kívánt rendszer stabilitására.

A dolgozatban közölt számításokat standard hőmérsékleten és nyomáson végeztük ($T=298,15$ K, $p=1$ atm= $98066,5$ Pa). A kapott rezgési frekvenciák segítségével kiszámíthatóvá váltak a zéruspont rezgési energia (ZPE), a termikus energiakorrekció, az entalpia és a szabadentalpia értékei is.

Egy adott konformernek a fenti számítások alapján nyert belső entrópiája felbontható translációs, forgási (együtt: mozgási), és rezgési tagokra:

$$S_{TOT} = S_{trans} + S_{rot} + S_{vib} = S_{mozgási} + S_{vib} \quad (S_{el} = 0) \quad (7)$$

Számításainkból kiderül (ld. 6.1.2.), hogy dimerizáció során 3 translációs és 3 rotációs módus eltűnik ($\Delta S_{mozgási}$), és helyette 6 új rezgési módus jelenik meg (ΔS_{vib}). A 3-3 „mozgási”

módus eltűnése csökkenti az entrópiát, ám hogy a képződő dimerben a $3N$ darab szabadsági fok megmaradjon, kialakulnak az új rezgési módusok (a létrejövő H-kötések mentén), amelyek entrópia hozzájárulása a rendszer rendezetlenségét növeli. A peptidszálak aggregációjának pontosabb megértéséhez szükség lehet az újonnan megjelenő rezgési módusok részletesebb vizsgálatára, amelyet az antiparallel, 10 és 14 tagú H-kötéses gyűrűkre végeztünk el.

Első megközelítésünk a dimerrezgések azonosítását illetően azon a feltételezésen alapult, hogy az atomok mozgásában a peptidszálon belüli egyidejű elmozdulások dominálnak, amelyek nincsenek hatással az egész redő geometriájára, tehát a rezgések a szálon belül változtatják meg az atomok helyzetét, a szálak közötti távolság közelítőleg azonos marad. Ha ez az érték mégis változik, a szálak geometriája pedig azonos marad, akkor beszélhetünk *új* dimer rezgésekről, amelyek monomer rezgések lineáris kombinációjaként már nem állíthatók elő. A Quaternion fit^{33,34} segítségével térben egymásra illesztve az atomokat, és helyzetüket összevetve a rezgés (amelyet az atomok elmozduláskoordinátái alapján számított vektor hatása reprezentál) lejátszódása előtti és utáni pozíciójukkal, a kapott atomi távolságkülönbségek összegét véve jellemezhető a szál geometriájának megváltozása. Ebben az esetben csak a dimerek egyik szálát vizsgáljuk. Az illesztés alapján kiválasztott 6 legkisebb eltéréshez tartozó rezgés (amely során a legkevésbé deformálódik a szál) mondható új dimer rezgési módusnak. Eredményeink azt mutatják, hogy ily módon jelentős különbségek figyelhetők meg az első hat, tehát a legjobban illeszkedő, és a többi normál rezgési módus között.

Egy másik lehetőség az újonnan megjelenő dimerrezgések azonosítására az, hogy azokat közvetlenül a dimerekhez rendelhető mozgásnak tekintjük, amelyek a monomerekben nem figyelhetők meg. Ahhoz, hogy a dimer és a monomer rezgések összevethetők legyenek, a monomer minden atomját a dimer egy-egy atomjának kell megfeleltetni, majd pedig „összeskálázzuk” a monomer és a dimer elmozdulásvektorait, vagyis a legnagyobb elmozdulásvektorok hossza azonos lesz az éppen összehasonlított két rezgés esetében. Ezután az azonos helyzetű atomokhoz rendelt elmozdulásvektorok különbségét képezzük úgy, hogy figyelembe vesszük a normál (a Gaussian kimentben szereplő), illetve az ellentétes irányt is, mert mindkétféleképpen csatolódhatnak a módusok. Az analízis során figyelembe vesszük még a kimenetben szereplő monomer rezgések mellett a "nulla" rezgést is, amikor az atomok nem mozognak, mivel elképzelhető, hogy míg az egyik szál rezeg, addig a másik nem. A különbségek összeadása után kapott rezgési állapotokhoz egy számot rendelünk, amelyek közül a legkisebb eltéréshez tartozó értékeket tekintjük a rezgési állapot leírásának. A sorba rendezés után kiszűrjük a dimerizáció következtében megjelenő új rezgési állapotokat, ezek azok, amelyek egyáltalán nem,

vagy pedig rosszul írhatók le a monomer rezgések alapján. A kritériumok a következők: a rezgés frekvenciája nem vehet fel nulla értéket, valamint a dimerek és a monomerek rezgési frekvenciájának különbsége nem lehet kisebb a dimer frekvenciájának 20 %-ánál, illetve 200 cm^{-1} -nél. Ha a dimer rezgésre nem található az előbbieknak megfelelő leírás, akkor az új módusnak tekintendő.

Sok esetben a dimerrezgések nem írhatók le csupán egyetlen monomer rezgés figyelembe vételével, szükség lehet egyes monomer rezgések lineáris kombinációjának képzésére a megfelelő leíráshoz. Ekkor az atomok megfeleltetése és a rezgési elmozdulásvektor hatásának figyelembe vétele után ez egyes dimerrezgéseket a normál monomer rezgések lineárkombinációjával közelítjük, mind pozitív, mind negatív előjellel figyelembe véve azokat. A szűrési feltételek a fentiekhez hasonlóak: a különbség a monomer és dimer rezgési frekvencia között nem lehet több 10 %-nál, illetve 200 cm^{-1} -nél. A program kimenetében a 3 legjobb, a szűrési feltételeket kielégítő lineáris kombináció szerepel, az ún. CCA+ programban³⁵ leírt algoritmust alkalmazva. Az adott normál rezgési módus dimerrezgésnek tekinthető, ha a „nulla” rezgési módus aránya nagyobb 50%-nál, vagy pedig a legnagyobb koefficienssel szereplő komponens hozzájárulása kevesebb, mint a második legnagyobb arányban jelen levő módus hozzájárulásának másfélszerese, tehát ha nem tudunk egy domináns monomer rezgést azonosítani a lineáris kombinációban.

5.3. NBO analízis

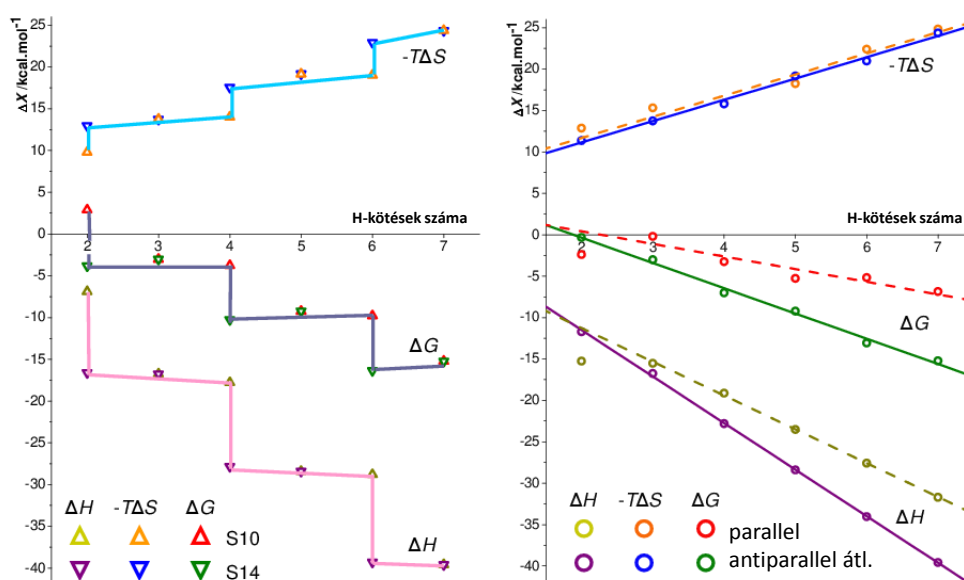
Az antiparallel β -redők építőkövei, a 10 és 14 tagú H-kötésű gyűrűk eltérő stabilitásának vizsgálatára Natural Bond Orbital analízist alkalmaztunk. Ehhez az NBO 5.9 programot³⁶, illetve az ábrák készítéséhez az NBOView 1.1 programot használtuk. Az előzőleg adott elméleti szinten optimalizált szerkezetekre (adott hullámfüggvény) lefutattuk a teljes NBO számítást, majd megkerestük a stabilizáló kölcsönhatásoknak megfelelő pályaátfedéseket, illetve a hozzájuk tartozó stabilizációs energiákat, amelyeket az NBO program másodrendű perturbációs technikával számít. Ezek alapján magyaráztuk a két rendszer eltérő tulajdonságait, keletkezésükkel fellépő különböző termodinamika változásokat.

6. Eredmények és következtetések

6.1. Oligopeptidek dimerizációja

6.1.1. Termodinamikai függvények változása a dimerizáció során

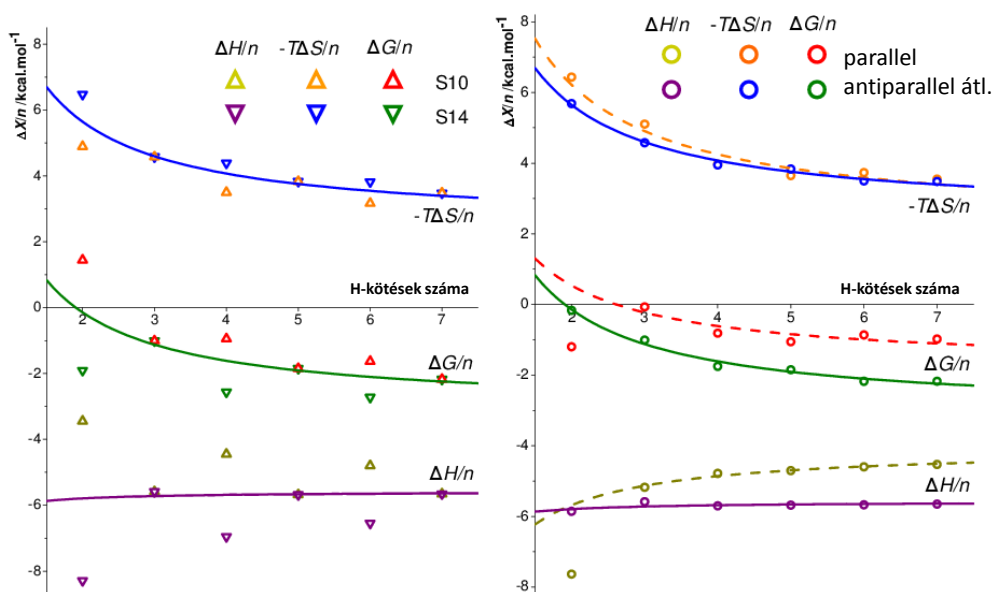
A $\Delta X = -T\Delta S$, ΔH és ΔG termodinamikai függvények értékeinek változása az 1-6 egységet tartalmazó oligopeptid szálak dimerizációja során, mind antiparallel, mind parallel β -redő képződése esetén a következő ábrán látható:



3. ábra: Bal oldal: $-T\Delta S$, ΔH és ΔG a láncközi H-kötések számának függvényében antiparallel β -redő képződése esetén. Jobb oldal: $-T\Delta S$, ΔH és ΔG értékei a láncközi H-kötések függvényeként parallel dimerek (szaggatott vonal, 12 tagú gyűrűk) és a két antiparallel dimerhez tartozó átlagolt értékek esetén (folytonos vonal, 10- és 14 tagú gyűrűk).

A páratlan számú aminosav egységet tartalmazó antiparallel dimerekhez tartozó $-T\Delta S$ értékek átlagát a H-kötések függvényében ábrázolva egyenest kapunk, $R^2=0,993$ Pearson korrelációs koefficienssel. Ez, és a parallel dimerek esetén kapott $R^2=0,946$ -os érték igen jó korrelációt mutatnak. Ennek tükrében nagy statisztikai biztonsággal mondhatjuk, hogy a dimerizációhoz kapcsolódó $-T\Delta S$ entrópia járulék egyenesen arányosan változik a láncközi H-kötések számának növekedésével. Következő lépésként a H-kötések számával normált $-T\Delta S$ értékeket vizsgáltuk a

H-kötés- szám függvényeként (ld. 4. ábra). Ekkor a kapott görbék egy-egy konstans értékhez tartanak, antiparallel esetben ez 2,50 kcal/mol, parallel redő esetén pedig 2,28 kcal/mol.



4. ábra: Bal oldal: $-T\Delta S/n$, $\Delta H/n$ és $\Delta G/n$ vs. láncközi H-kötések száma (n) antiparallel β -redőben, és átlagértékeik páratlan n esetén. Jobb oldal: $-T\Delta S/n$, $\Delta H/n$ és $\Delta G/n$ vs. láncközi H-kötések száma (n) parallel redő esetén (szaggatott vonal) és az antiparallel dimerekhez tartozó átlagértékek (folytonos vonal).

A dimerizációs entalpia változása (ΔH) a kialakuló H-kötések számától lépcsőzetes függést mutat, ami összefüggésben van azzal, hogy a páratlan számú aminosavat tartalmazó peptidszálak antiparallel dimerjeinek egymáshoz energiában közel eső, két különböző szerkezete létezik. Az átlagértékeket a H-kötések függvényében ábrázolva ez esetben is egyenest kapunk ($R^2=0,999$ antiparallel és parallel redőre is). A H-kötésekre normált $\Delta H/n$ függvény (4. ábra) görbéje a $-T\Delta S/n$ görbéhez hasonlóan konstans értékhez tart, ami az antiparallel és parallel esetben rendre -6,83 kcal/mol és -5,54 kcal/mol. A 3. ábrán az is jól látható, hogy antiparallel β -redő estén a H-kötésekre normált ΔH értékek kevésbé függenek a létrejövő kötések számától, közel vízszintes vonalat kapunk a $\Delta H/n$ függvényre. A fenti jelenség miatt a ΔG függvény értékei is lépcsőzetesen változnak a lánc hossz növekedésével (3. ábra). Az átlagértékek itt is egyenesen arányos függést mutatnak a H-kötések számától ($R^2=0,997$ antiparallel és $R^2=0,975$ parallel esetben). A normált ΔG függvény a -4,34 kcal/mol-os ΔG^∞ értékhez konvergál antiparallel dimert tekintve, és -3,26 kcal/mol-hoz parallel redő esetén.

Megfigyelhető, hogy az (1) egyenletbeli entrópia tag ($-T\Delta S$) hidrogén kötések számától való függése jelentősebb, mint az entalpiatag (ΔH). Ez alapján arra következtethetünk, hogy a β -redő képződése (az első, dimerizációs lépést tekintve) kis aminosavszámnál entrópiusan kevésbé

kedvezményezett, de ez a hatás gyorsan csökken a peptidet alkotó aminosavak számának növekedésével. Az, hogy mind a $-T\Delta S$ entrópia járulék, mind az entalpia függvény normált értékei egy-egy adott értékhez konvergálnak, azt jelzi, hogy hat- és annál több aminosavat tartalmazó rendszerekre nézve a redőképződés entalpianyeresége és entrópiavesztése nem függ az összekapcsolódó szálakat alkotó aminosavak számától. A kapott eredmények azt mutatják, hogy dimerizációs folyamat entalpianyeresége mindig meghaladja az entrópiában beálló veszteséget, így a redők képződését meghatározó ΔG függvény minden esetben negatív értéket vesz fel, jelezve, hogy – egyelőre csak az első, dimerizációs lépést figyelembe véve – a redőképződés nagyobb rendszerek számára termodinamikailag mindig kedvező lesz. Ez az állítás összhangban áll a kísérletekkel is, amelyek során számos alkalommal mutatták ki amiloidszerű peptidek képződését.

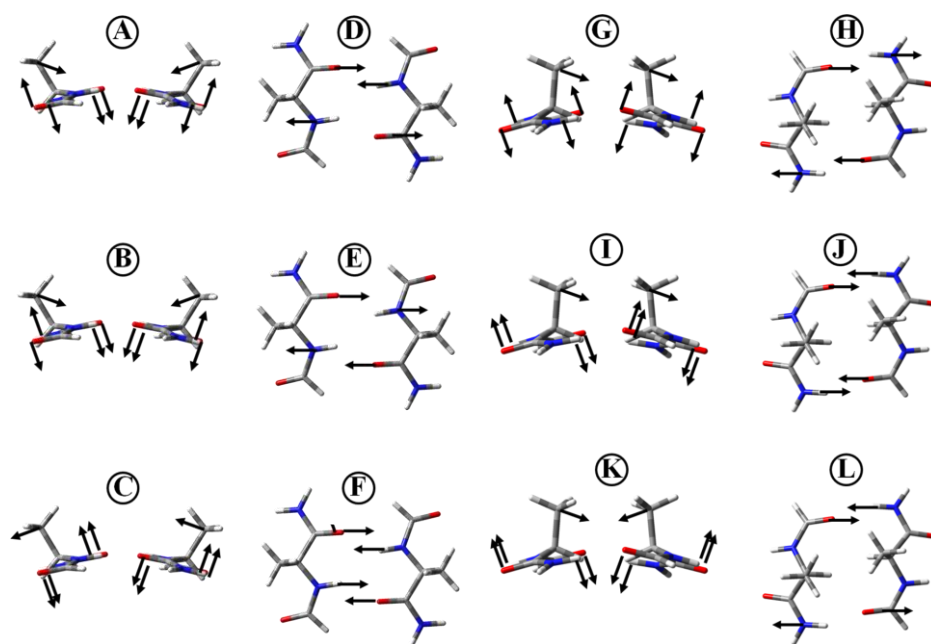
Parallel β -redők vákuumban történő modellezése során a szálak utolsó aminosav egységei γ -kanyar konformációt vesznek fel, vagyis egyazon aminosav amid- és karbonilsoportjának H- és O-atomjai között jön létre H-kötés (természetesen emellett a redőalkotó H-híd kötés is kialakul). Ez a jelenség, mint artifaktum jelentős energiacsökkenést eredményez az egy egység „hosszú” dimer képződését tekintve, ezért az ehhez tartozó adatpontokat az illesztések során nem vettük figyelembe.

6.1.2. *Antiparallel dimer β -redős szerkezetek rezgési analízise*

A ΔH és $-T\Delta S$ függvények értékeinek a peptidlánc hosszától való függésének lépcsőzetes természete számos okra visszavezethető. Az újonnan megjelenő 6 rezgési módusnak (ld. lentebb: 5. ábra) – amelyek csak a dimerekben figyelhetők meg, a monomerekben nem – a fentebb leírt rezgési analízis módszereivel történő részletes vizsgálata lehetővé tette számunkra, hogy behatóbban tanulmányozzuk a 10 és 14-es gyűrűk különböző entrópia hozzájárulásának eredetét.

Tekintve, hogy a megfigyelt új rezgések gyengébb, másodrendű kötések mentén kialakuló rezgési módusok, azt várjuk, hogy alacsony frekvenciával jelennek meg. Így elegendőnek tűnik a dimerek első 10 legkisebb frekvenciával ($\nu < 200 \text{ cm}^{-1}$) rendelkező rezgésének részletes analízise. A 10 és 14 tagú nanorendszereknek mind a frekvencia, mind az entrópiabeli hozzájárulása eltérőnek adódott. Mindkét szerkezetben az 5., a 9. és a 10. rezgés tartozik a kialakuló H-kötések menti „torzuláshoz”. A 10-es gyűrűben mérhető H-kötés menti távolság nagyobb, mint a 14-es gyűrűs szerkezetben, ami gyengébb, alacsonyabb frekvenciájú rezgésekben, ezáltal nagyobb entrópia hozzájárulásban nyilvánul meg. Az 1., a 2. és a 3. leggyengébb rezgési módus a gerincbeli

C α atomok mozgásához kapcsolódik. Hasonlóan a H-kötésekhez, a C α -C α távolság ugyancsak nagyobb a 10, mint a 14 tagú gyűrűkben, így az e mozgáshoz tartozó rezgési frekvencia kisebb, ami tehát szintén hozzájárul a 10 atomot tartalmazó pszeudogyűrűk jelentősebb hatásához a redő entrópia növekedésében. Összességében azt mondhatjuk, hogy hiába nagyobb a 10 tagú gyűrűk hozzájárulása az entrópiához, az entalpianyereség annyival kisebb a dimerizáció során ebben az esetben, hogy ekkor a ΔG kisebb mértékben csökken, mint a 14 tagú gyűrűk esetén, így a 10 atomból álló H-kötött gyűrűk képződése termodinamikailag kedvezőtlenebb, mint a 14 tagúaké.

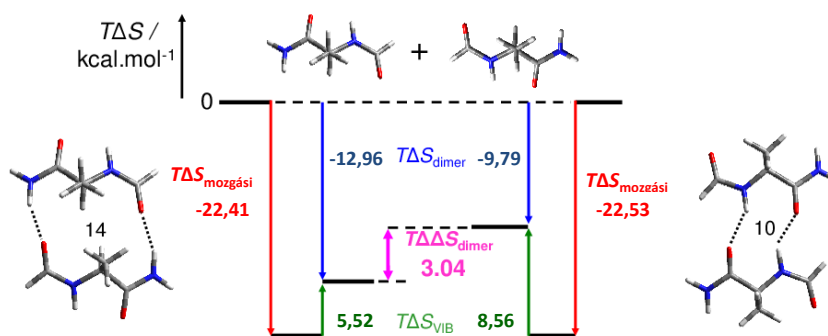


5. ábra: A-F: a dimerizációs során megjelenő 6 "új" dimerrezgés sematikus ábrázolása a 10 tagú pszeudogyűrűs rendszerekben. G-L: a 14 tagú gyűrűk 6 új dimerrezgésének vázlata.

Számításaink a vártaknak megfelelően a $TS_{mozgási}$ entrópiatag jelentős csökkenését mutatják, amely nagybani komplexitás-vesztést jelez a dimerizáció során. Ez a csökkenés a kétféle gyűrűs rendszert tekintve alig különbözik, a 40,89 kcal/mol-os értékről rendre 22,41 kcal/mol és 22,53 kcal/mol a 10 és 14 atomos gyűrűk esetén. Mindez a $TS_{mozgási}$ tag molekulatömegetől való függésével magyarázható, amely a kétféle antiparallel β -redőre nézve (és a parallel változatra is) ugyanaz, tekintve, hogy azonos számú és minőségű atomokból állnak.

A dimerek képződése a hat új dimerrezgés megjelenése mellett a monomer módusoknak egy szimmetrikus és egy antiszimmetrikus rezgésre történő felhasadását is eredményezi, ami természetesen hatással van az utóbbiak entrópiához való hozzájárulására. Érdekes, hogy ez a felhasadás nem szimmetrikus, mivel a rezgések inkább nagyobb frekvenciák felé tolódnak el, így a különbségeket összegezve negatív entrópia járulékos értékeket kapunk, a szimmetrikus rezgések

esetében ez -1,95 kcal/mol, az antiszimmetrikus esetben -1,73 kcal/mol. (a nagyobb frekvenciájú rezgések alacsonyabb entrópia hozzájárulást eredményeznek.) Ez azt jelenti, hogy a dimerizációs folyamat során nem csak a $TS_{mozgási}$, hanem a monomerek rezgési módusainak entrópiavonzata, a $TS_{monomer}$ tag értéke is csökken. Így tehát csak a hat új dimerrezgéshez kapcsolódó $T\Delta S_{dimer}$ rezgési entrópiátagnak kompenzálja a dimerizáció során fellépő entrópia veszteséget.



6. ábra: Antiparallel β-redő képződésének entrópia-diagramja 14 (balra) és 10 (jobbra) atomból álló H-kötésű pszeudogyűrűs szerkezetből, az M05-2X/6-311G++(d,p)//M05-2X/6-31G(d) elméleti szinten nyert adatok alapján.

A fenti ábrán látható a 10-es és 14-es gyűrűs rendszerek rezgési entrópia hozzájárulásának nettó különbsége, amely közelítőleg akkora, mint a 3. ábrán kapott lépcső „lépcsőfokmagassága”, aminek következményeképpen elmondható, hogy a kétféle antiparallel redőbeli szerkezeti elem eltérő stabilitásának egyik fő okozója a fenti entrópia-különbség.

A fent részletezett, újonnan kidolgozott módszerek segítségével csupán a kevésbé összetett, két-két aminosavból álló dimerek rezgési analízisére nyílt lehetőség. Az ennél nagyobb rendszerek rezgéseinek ilyen jellegű részletes vizsgálata a szerkezet bonyolultsága, és a rezgési módusok csatolódása miatt a mi módszereinkkel lehetetlennek bizonyult. Ennek ellenére ezeknek az alanindimereknek a vizsgálatából is kiderül, hogy az entrópiafüggvény antiparallel β-redő képződése során mutatott lépcsős természetének eredete a két eltérő szerkezeti elem (a 10 és 14 tagú gyűrűk) rezgéseinek eltérő entrópia járulékával magyarázható.

6.1.3. A dimerizáció általános jellemzése

Az alábbi táblázat alapján nem tűnik olyan jelentősnek a dimerizációs folyamatot jellemző termodinamikai függvények értékeiben beálló változás, mégis ez vezet először β-redők, majd pedig a szervezetben megtalálható plakkok keletkezéséhez. Amint a lenti adatokból is jól látszik ($\Delta\Delta G = -1,32$ kcal/mol), az első, dimerizációs lépést tekintve hosszabb polipeptidekre a kétféle

szerkezet közül az antiparallel változat képződése a kedvezményezett ($\Delta G = -3,08$ kcal/mol antiparallel, és $\Delta G = -1,76$ kcal/mol parallel redő esetén).

	parallel TD. függvények	antiparallel TD. függvények	különbség
$\Delta S / \text{cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	-7,65	-8,38	-0,73
$-T\Delta S / \text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	+2,28	+2,50	+0,22
$\Delta H / \text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	-4,04	-5,58	-1,54
$\Delta G / \text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	-1,76	-3,08	-1,32

1. táblázat: A β -redők képződésének kezdeti lépéseit leíró normált termodinamikai paraméterek összevetése az M05-2X/6-31G(d) elméleti szinten nyert adatok alapján.

Habár az amiloid-szerkezetű plakkokon (pl. A β 1-42)³⁷ végzett kísérletek a parallel β -redőkből való képződést jósolták kedvezőbbnek, a fent ismertetett elméleti vizsgálatok eredménye ezeket kevésbé stabilnak mutatja, amelyből arra következtethetünk, hogy valamilyen kisebb perturbáció is elegendő lehetne ahhoz, hogy a plakk-képződés az ellenkező folyamatba, disszociációba forduljon át. Már 7,65 cal/molK értékű H-kötésenkénti entrópia csökkenés kompenzálni tudná a képződési folyamat során fellépő entalpia nyereségből adódó stabilitást (szálanként), ami relatíve kis számérték, és arra enged következtetni, hogy a plakk-képződés megállítása, és esetleges visszafordítása a jövőben nem reménytelen feladat.

6.2. Peptidszálak oligomerizációjának vizsgálata

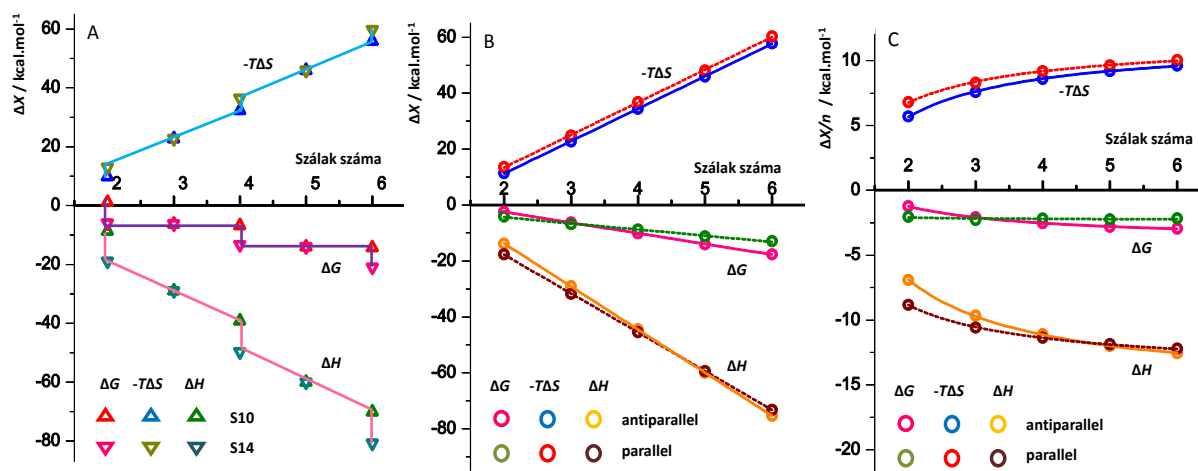
6.2.1. Monoalanin oligomerek parallel és antiparallel szerkezeteinek összehasonlítása

Az eddig bemutatott vizsgálatokból kiderült, hogy oligopeptidek dimerizációja során a β -redős szerkezet képződése minden esetben kedvező, és a folyamatot jellemző termodinamikai függvények megváltozásának normált értékeit felhasználva a redők stabilitása jósolható is nagyobb rendszerekre nézve. Hogy a redőképződés folyamatáról teljesebb képet nyerjünk, a redő kiterjedésének egy másik dimenzióját is tanulmányoztuk, ugyanazon számításokat végezve a modellrendszereken, amelyeket a dimerizáció során is alkalmaztunk, teljes szerkezetoptimalást és frekvenciaszámítást. Ebben az esetben monoalanin és dialanin egységekből képződő, 2-6 „szálból” álló oligomereket használtunk fel a β -redős szerkezet modellezésére.

A β -redő ilyen irányú kiterjedését vizsgálva, a monoalanin oligomerek esetében ismét egy lépcsőzetes formája adódik a folyamatot leíró termodinamikai függvények változásának, $-T\Delta S$ -nek, ΔH -nak és ΔG -nek, ám ez esetben rendszert alkotó szálak számának függvényében (ld. lejjebb a 7/A ábrát) vizsgáltuk e változásokat. Az oligomerizációs folyamat jellemzésére

szemléletesebbnek gondoltuk az oligomer szálainak számától való függés bemutatását, mint a függvényeknek a kialakuló H-kötések számával való alakulását, mivel célunk volt megállapítani az egy *egység* hozzáadásakor bekövetkező változást. Míg a dimerek esetében egy egység (egy aminosav) hozzáadása 1 H-kötés kialakulását eredményezi, addig a szálak (mint egységek) összeállásakor több, monoalanin esetén 2, dialanin esetén pedig 3 H-kötés alakul ki, tehát a peptidszálak számának alapul választása célszerűbbnek bizonyult a kitűzött cél szempontjából.

A monoalaninból kiinduló oligomerizáció esetén is többféle szerkezet jöhet létre páros szálát tartalmazó antiparallel redő képződése esetén attól függően, hogy a 10-, avagy a 14-tagú H-kötésű gyűrűs szerkezetek dominálnak az oligomerben. Az előbbi esetben az *s10*, az utóbbiban az *s14* szimbólum használatával különböztetjük meg a kialakuló szerkezeteket. Ahogy az a monoalanin-dimereken elvégzett rezgési analízisből kiderült, a vizsgált termodinamikai függvények lépcsős természetű változása e kétféle építőelemnek a rendszer entrópiájához való eltérő mértékű hozzájárulásával magyarázható. A szálak összekapcsolódásakor sincs ez másképpen, a hasonló lépcsős függvényalaknak hasonló eredetet tulajdoníthatunk, viszont nagyobb oligomerekre a fent alkalmazott módszerek egyikével sincs lehetőségünk rezgési analízist végezni a komplexek mérete és bonyolult módon csatoló rezgéseik miatt.



7. ábra: A: $-T\Delta S$, ΔH és ΔG vs. szálak száma monoalanin antiparallel β -redőben. B: $-T\Delta S$, ΔH és ΔG vs. szálak száma parallel oligomerek (szaggatott vonal, 12 tagú gyűrűk), illetve a kétféle antiparallel oligomerhez tartozó átlagértékek (folytonos vonal, 10- és 14 tagú gyűrűk) esetén monoalaninra. C: $-T\Delta S/n$, $\Delta H/n$ és $\Delta G/n$ vs. szálak száma (n) parallel oligomerek (szaggatott vonal), illetve a kétféle antiparallel oligomerhez tartozó átlagértékek (folytonos vonal) esetén monoalaninra

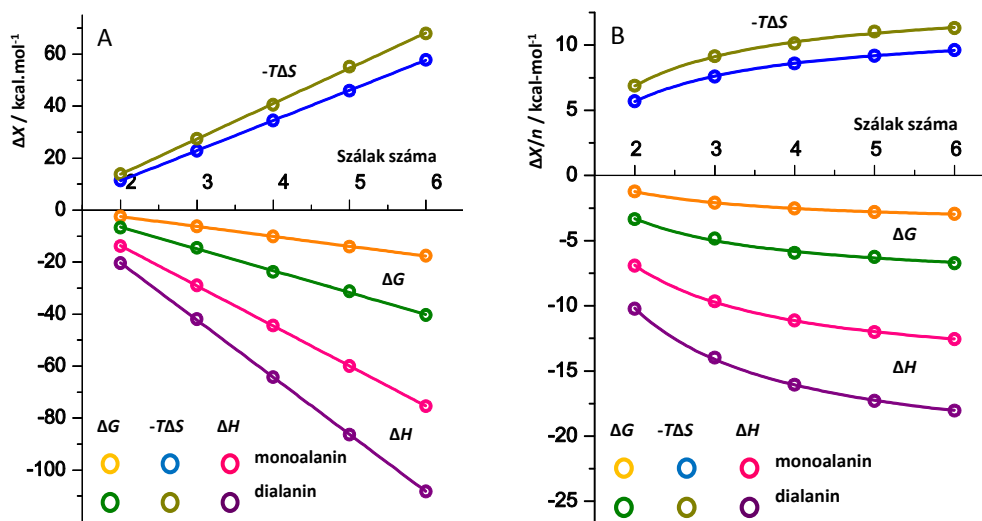
Összevetve az antiparallel redő esetén kapott értékek átlagait (amelyek a vártaknak megfelelően egy egyenesre esnek: $R^2=0,999$) a parallel eset függvényértékeivel (7/B ábra), azt tapasztaltuk, hogy bizonyos szálszám felett az antiparallel redő mutatkozik stabilabbnak, míg

kevés szálát tartalmazó rendszerekben először a parallel redő kialakulása kedvezőbb. Mégis, a dimerizáció folyamatához hasonlóan, itt is azt a következtetést vonhatjuk le, hogy nagy rendszerek képződése esetén antiparallel redő kialakulása várható. Normálva az egyes termodinamikai függvények megváltozásának értékeit, megkaphatjuk a folyamatot egy egység (szál) hozzáadása esetén jellemző relatív változást. Ez teszi majd lehetővé a függvényértékek alakulásának, így a várható stabilitásnak a becslését nagyobb rendszerekre illetően, ahogy ezt a dimerek képződésének tanulmányozásánál is láthattuk. Amint azt a 7/C ábra mutatja, az említett függvényérték-változások szálaak száma szerinti normálásával az oligomerizációs folyamatra is jellemzően egy-egy konstans értékhez tartó, hiperbolikus görbét kaptunk. Megfigyelhető, hogy a második egység hozzáadása felett az antiparallel redő kialakulása lesz kedvezőbb ($\Delta G^\infty = -3,83$ kcal/mol antiparallel, míg $\Delta G^\infty = -2,30$ kcal/mol parallel esetben), egy egység esetén azonban a parallel változat a stabilabb. Így tehát, mivel a ΔG érték antiparallel esetben nagyobb mértékben csökken, a kialakuló redő stabilabbnak adódik.

6.2.2. *Antiparallel mono- és dialanin oligomerek stabilitásának összevetése*

Az előző pontban a többszálú, monoalaninból képződő antiparallel és a parallel redők tulajdonságait vetettük össze. A β -redő szerkezetének jobb közelítése érdekében dialanin szálaakból álló oligomerekre is elvégeztük a fenti számolásokat, azonos elméleti szinten. Ebben az esetben a keletkező antiparallel redők tulajdonságait hasonlítottuk össze mono- és dialanin szálaakra nézve. A mono- és dialanin egységekből kiinduló oligomerizáció folyamatát vizsgálva, és a monoalanin oligomerek esetében a különböző antiparallel szerkezeti elemekre (s10 és s14) vonatkozó értékek átlagát figyelembe véve ábrázoltuk a folyamatot jellemző egyes termodinamikai függvények megváltozását a szálaak számának függvényében (8/A ábra). A dialanin szálaak esetén, mivel minden szál hozzáadásakor kialakul egy 10 és egy 14 atomot tartalmazó H-kötéses gyűrű is, nem szükséges átlagértékek képzése, mert minden dialanin oligomernek csak egyféle szerkezete létezik. Mind a mono-, mind a dialanin szálaakat tekintve egyenesen arányos függést kapunk ($R^2 = 0,999$ mindkét esetben) azok számától. A 8/A ábrán látható függvények értékeit normáltuk a szálaak száma szerint (ld. 8/B ábra), így nyerve a rendszerhez történő egy szál hozzáadása esetén fellépő változások mértékét. Ez alapján a redők stabilitása a későbbiekben jósolható lesz, hiszen az így kapott hiperbolikus görbék az eddigiekhez hasonlóan ugyancsak konstans értékekhez konvergálnak. A vártaknak megfelelően mindkét oligomerizációs folyamat kedvezőnek mutatkozik ($\Delta G^\infty = -3,83$ kcal/mol monoalanin, és $\Delta G^\infty = -8,34$ kcal/mol dialanin egységek esetén). A dialanin oligomer rendszerekre kapott egyenes

arányos függés egyenleteinek nagyobb meredekség értékeiből, valamint az ebből adódó jelentősen alacsonyabb ΔG^∞ értékből arra következtethetünk, hogy a dialanin szálak aggregációja a monoalanin egységeknél is kedvezőbb, stabilabb redős szerkezetet eredményez.



8. ábra: A: $-T\Delta S$, ΔH és ΔG vs. szálak száma antiparallel β -redőben mono- (átlagértékek) és dialanin esetben. B: $-T\Delta S/n$, $\Delta H/n$ és $\Delta G/n$ vs. szálak száma (itt n) antiparallel redőben mono- és dialanin egységek esetén.

A fenti eredmények tükrében elmondhatjuk, hogy a β -redős szerkezetet pontosabban közelítő dialanin oligomerek stabilitása jelentős, és ez valószínűsíthetően nagyobb rendszerek kialakulása esetén sem csökken, tehát a β -redők képződése minden esetben spontán folyamat. További elvégzett, ám itt nem részletezett számításainkból az is kiderül, hogy a dialanin szálak összeállása esetén szintén, nagyobb (4, 5 és a fölött) szálszám esetén, antiparallel redő alakulása jósolt. Ezen eredmények alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az antiparallel β -redők stabilitása igen jelentős, képződésük erősen kedvezményezett.

6.3. Antiparallel redők építőköveinek NBO analízise

6.3.1. Az analízis menete

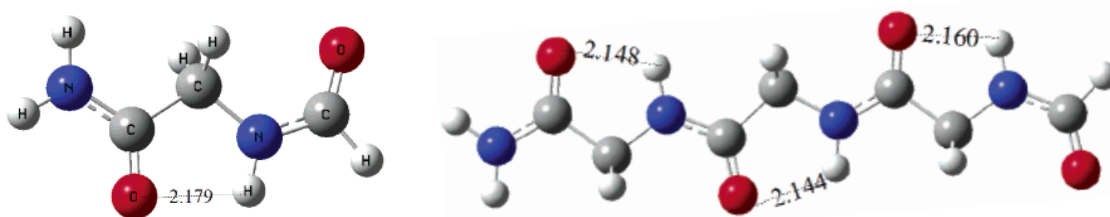
Az antiparallel β -redők képződésének termodinamikai vizsgálata során kiderült, hogy az azokat alkotó 10 és 14 tagú H-kötésű gyűrűk eltérő hozzájárulással vesznek részt a keletkezett szerkezet stabilitásában. Ennek magyarázatára először rezgési analízist végeztünk, mely azt az eredményt szolgáltatva, hogy a 10-es gyűrűk kialakulása során fellépő entrópia csökkenés összességében kisebb, mint ugyanez a 14-es gyűrűk képződésekor. Ám a számításainkból nyert

szabadentalpia-értékek alapján a 14-es gyűrűs szerkezet adódott stabilabbnak, valószínűsíthetően az utóbbi esetben fellépő nagyobb entalpianyereség miatt. A rezgési analízis magyarázatul szolgál az egyre növekvő kiterjedésű antiparallel redők kialakulása során bekövetkező lépcsős jellegű változásokra az entrópia függvényértékekben, amelyek mind az aminosav egységek, mind pedig a peptidszálak számának növelése esetén megfigyelhetők voltak.

Hogy az antiparallel redők két alapvető építőelemének eltérő viselkedését mélyebben, a rendszer hullámfüggvényének szintjén is megértsük, és ezáltal az entalpiafüggvény lépcsősségét megpróbáljuk magyarázni, NBO analízist alkalmaztunk ezek vizsgálatára. Ezt a $[\text{HCO}-(\text{Ala})-\text{NH}_2]_2$ összegképletű, kétféle (s10 és s14) modellszerkezetre végeztük el, amelyeket előzőleg a M05-2X/6-311G++(d,p) (TZP) szinten optimaltunk. Ugyanezt a szerkezetoptimalást a B3LYP funkcionállal is elvégeztük, az előző módszerrel kapott eredményeink alátámasztása végett.

Elsődleges szempont az analízis során a két egység között létrejövő H-kötések vizsgálata volt, az ebben részt vevő pályák átfedésének, és az ezekhez tartozó stabilizáló energia (valójában entalpia) meghatározása (a következőkben mindig nyereségnek, azaz abszolút értékben entalpiacsökkenésnek értendő), amelyet az NBO 5.9 program másodrendű perturbációs módszer segítségével¹⁶ becsül.

A rendszer H-kötéseinek vizsgálata mellett más, a két szál egyéb pályáinak átfedéséből adódó stabilitási tényezőket is megvizsgáltunk, amilyen például a 14-es gyűrű esetén a két metil-oldallánc kapcsolata. Dannenberg és munkatársai³⁸ a kétféle antiparallel alapegység vizsgálata során egy újabb kölcsönhatást is kimutattak, az ún. C_5 H-kötésű gyűrűk létrejöttét. Ezek egy adott szálon belül alakulnak ki, egyazon aminosav $\text{C}=\text{O}$ oxigén nemkötő párja, és az N-H csoport H-je között. Ezen C_5 H-kötésekhez tartozó stabilizációkat is megkerestük az NBO analízis során.

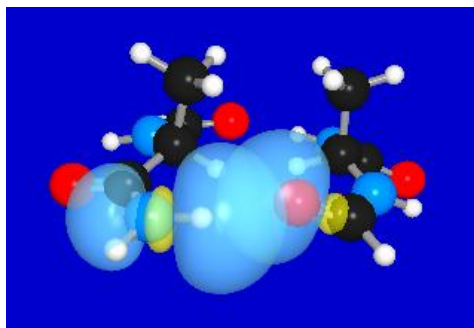


9. ábra: Egy peptidszálon belüli C_5 H-kötések (a számértékek a Dannenberg és munkatársai által használt B3LYP/D95(d,p) szinten számítottak, és Angström egységben értendők)³⁸

6.3.2. A 10 és 14 tagú gyűrűk stabilizációja

A 14-tagú H-kötésű gyűrűs szerkezet NBO analízise során, mint említettük, először a két szál között kialakuló H-kötésekhez tartozó átfedéseket kerestük meg. Ezek az M05-2X funkcionál segítségével TZP bázison optimált szerkezetek esetén az egyik „szál” karbonilcsoport oxigénjének egyik nemkötő elektronpárja és a másik „szál” amid N-H kötésének lazító pályája (6,06 kcal/mol) és ugyanennek az oxigénnek a másik nemkötő párja és ugyanezen lazító pálya közötti donor-akceptor kölcsönhatásból (0,78 kcal/mol), valamint az N-H hidrogénatom egyik betöltetlen (virtuális) pályája és a másik „szál” C=O egyik kötőpályájának átfedéséből (0,74 kcal/mol) adódnak. (B3LYP funkcionállal optimált szerkezet esetén ezek az értékek rendre 5,74 kcal/mol, 1,03 kcal/mol és 0,7 kcal/mol).

A 10-es gyűrűk esetében a szálak közötti H-kötések energiaviszonyai a következőképpen alakulnak. A karbonil C=O és a „szemben levő” N-H közötti 2 féle $n \rightarrow \sigma^*$ kölcsönhatás stabilizációja M05-2X funkcionállal optimálva (a B3LYP esetén kapott értékek zárójelben láthatók) rendre 5,53 kcal/mol (4,98 kcal/mol) és 2,10 kcal/mol (0,00 kcal/mol), a C=O kötő és a H betöltetlen pálya átfedése 0,48 kcal/mol (0,60 kcal/mol).

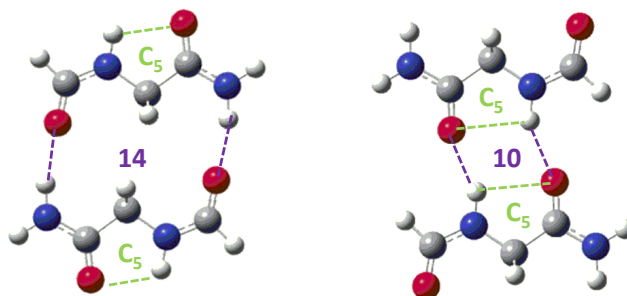


10. ábra: pre-ortogonális természetes pályák átfedés az egyik karbonil oxigén nemkötő elektronpárja és a "szemközti" N-H kötés lazító pályája között a 14-tagú gyűrűben

Összességében, csak a H-kötésekből adódó nyereséget összehasonlítva a két gyűrű között - a 14-es gyűrű esetén 15,16 kcal/mol (14,94 kcal/mol), a 10-es gyűrűben pedig 16,22 kcal/mol (11,16 kcal/mol) – nem mondható biztosan, hogy a 14-es gyűrű a stabilabb (főként mivel a van der Waals kölcsönhatásokat elvileg pontosabban leíró M05-2X funkcionál segítségével végzett számítások alapján a 10 tagú szerkezet adódik stabilabbnak).

Mivel eddigi számításaink alapján egyértelműen a 14-tagú gyűrű képződése a kedvezőbb, megvizsgáltuk, hogy milyen egyéb kölcsönhatások járulhatnak hozzá a szerkezet stabilizálásához a

10-es gyűrűvel szemben. Egyrészt a már említett C_5 gyűrű H-kötéséhez tartozó, a szálon belüli amid N-H és karbonil O nemkötő pályájának átfedéséből adódó stabilizációt, másrészt pedig a 14-es gyűrűn belül a szálak közötti esetleges metil oldallánc kölcsönhatásokat vizsgáltuk. A 14-es gyűrűben, amint az a 11. ábrán látszik, a C_5 szerkezet a gyűrűn kívül alakul ki, míg a 10-esben a szálak közötti H-kötéses gyűrűn belül.



11. ábra: C_5 H-kötéses szerkezetek kialakulása a 14 (bal), illetve a 10 (jobb) gyűrűkben

A C_5 gyűrűk kialakulásából származó energianyereség a 14-es tagszám esetén összesen (mindkét „szálnál” kialakul) 2,90 kcal/mol-nak (B3LYP: 2,00 kcal/mol) adódott, míg 10-es tagszám esetén 1,34 kcal/mol-nak (B3LYP: 0,00 kcal/mol-nak). Tehát részben ezzel a kölcsönhatással magyarázható a nagyobb gyűrű stabilitása.

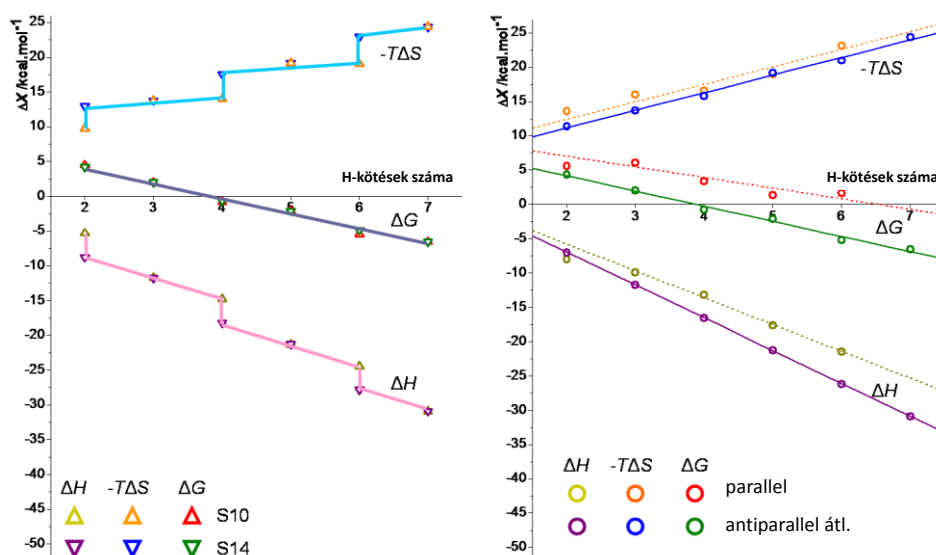
Harmadikként a csupán a 14-es gyűrűben kialakuló, a metil aminosav-oldalláncok közötti kölcsönhatásokat vizsgáltuk. Az ezekből adódó energianyereség is jelentősnek bizonyult, az egyik „szál” metilcsoportjának egyik C-H kötő pályája és a másik „szál” metilcsoportjának egyik C-H lazító pályája közötti átfedésből származó stabilizáció (a B3LYP funkcionál használata esetén kapott értékek továbbra is zárójelben láthatók) 0,56 kcal/mol (0,39 kcal/mol). Ezen kívül kölcsönhat még az egyik karbonil O két nemkötő elektronpárja a szemközti „szál” metilcsoportjának egyik C-H kötésének lazító pályájával, rendre 0,35 kcal/mol (0,42 kcal/mol) és 0,49 kcal/mol (0,58 kcal/mol) stabilitást nyerve. Így a metil oldalláncok részvételével összesen 2,80 kcal/mol (2,78 kcal/mol) energiát nyer a 14-es tagszámú gyűrűs rendszer.

Az fentiekben részletezett három kölcsönhatásból eredő stabilizációt figyelembe véve a 14-es H-kötésű gyűrűs rendszer energianyeresége 20,86 kcal/mol az M05-2X/6-311G++(d,p) optimált szerkezetet tekintve és 19,72 kcal/mol a B3LYP/6-311G++(d,p) szinten optimált rendszerre. A 10-es gyűrűre ugyanez rendre 17,56 kcal/mol és 11,16 kcal/mol. Ez az első esetből (M05-2X) kapott 3,3 kcal/mol-os energiakülönbség önmagában még nem magyarázza a 14-es gyűrűnek a ΔG függvény lépcsős természetéből adódó nagyobb stabilitását, viszont ha nem csak a három, általában „legfontosabbnak” ítélt kölcsönhatást tekintjük, hanem figyelembe vesszük a két

„szál” pályái közötti egyéb átfedéseket is, akkor a két gyűrű közötti különbség körülbelül 5 kcal/molnak adódik ezen az elméleti szinten. Emellett fontos megjegyezni, hogy az NBO 5.9 programban található energiabecslő módszer más szintű, mint az, amellyel a számításainkat végeztük, tehát a kapott számadatoknak nem az abszolút értékét érdemes ez esetben figyelembe venni, hanem a belőlük kitűnő tendenciát, azt, hogy mely kölcsönhatások stabilizálják a rendszereket, és egymáshoz viszonyítva milyen mértékben. Ezek alapján pedig vegyük észre, hogy nem a stabilitásért általában fő felelősnek tartott szálak közötti H-kötések adják a különbséget, hanem a gyengébb, ám szintén jelentős van der Waals kölcsönhatások, illetve a szálakon belül kialakuló H-kötések. A várt eltérést a két rendszer stabilitásában pedig a B3LYP funkcionál segítségével optimált szerkezetekre kapott értékek is alátámasztják. Mivel mind a négy, itt felhasznált szerkezetoptimalást TZP szinten végeztük, így a bázisátfedésből adódó hiba (BSSE) elhanyagolható.

6.4. β -redős szerkezetek stabilitása oldószerben

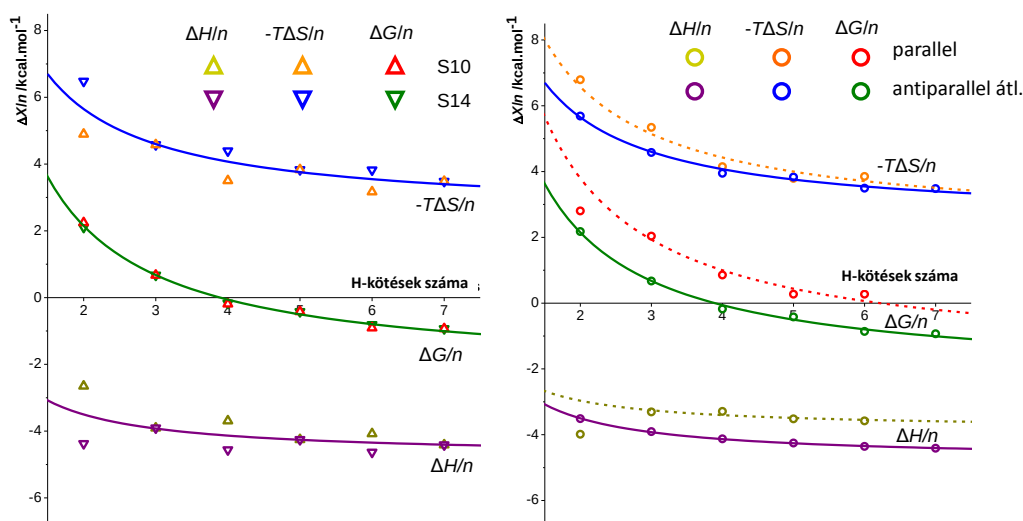
A vákuumban kapott számítási eredményeink megerősítése érdekében oldószeres, jelen esetben vizes közegben energiaszámítást végeztünk minden modellszerkezetre a M05-2X/6-311G++(d,p)// M05-2X/6-31G(d) elméleti szinten, az IEFPCM oldószermodellt alkalmazva. Ezek közül a dimerizáció vizsgálatához kapcsolódóan a következő tendenciákat kaptuk.



12. ábra: Bal oldal: $-T\Delta S$, ΔH és ΔG a láncközi H-kötések számának függvényében antiparallel β -redő képződése esetén vízben. Jobb oldal: $-T\Delta S$, ΔH és ΔG értékei a láncközi H-kötések függvényeként parallel dimerek (szaggatott vonal, 12-tagú gyűrűk) és a két különböző antiparallel dimerhez tartozó átlagolt értékek esetén (folytonos vonal, 10- és 14-tagú gyűrűk) vízben.

Amint az a 12. és a 13. ábrán jól látszik, az oldószerben végzett számítások eredményeiként is a vákuumbeli viselkedéshez hasonlóan alakul az egyes termodinamikai függvények változása az aggregációs folyamatok során. Bár az oldószer jelenléte destabilizálja a redős szerkezetet ($\Delta H/n = -4,77$ kcal/mol (-5,58 kcal/mol), $\Delta G/n = -2,21$ kcal/mol (-3,08 kcal/mol) antiparallel, $\Delta H/n = -3,91$ kcal/mol (-4,04 kcal/mol) $\Delta G = -1,55$ kcal/mol (-1,76 kcal/mol) parallel esetben; zárójelben a vákuumbeli értékek találhatók), ekkor is minden esetben kedvezőnek adódik annak kialakulása.

Antiparallel redőnél a ΔH és a $-T\Delta S$ függvények esetében megmarad a lépcsőzetes függés, azonban mivel a 10- illetve a 14 tagú gyűrűs szerkezetekre nem azonos az oldószer hatása, ezért az előbbi két függvény változásai „kiejtik” egymást, a ΔG értékek lineárisan csökkennek a peptidszálak hosszának növelésével. Csakúgy, mint vákuumban, vizes közegben is az antiparallel β -redők mutatkoznak stabilabban a parallel redőkkel szemben.



13. ábra: Bal oldal: $-T\Delta S/n$, $\Delta H/n$ és $\Delta G/n$ vs. láncközi H-kötések száma (n) antiparallel β -redőben, és átlagértékeik vizes közegben. Jobb oldal: $-T\Delta S/n$, $\Delta H/n$ és $\Delta G/n$ vs. láncközi H-kötések száma (n) parallel redő (szaggatott vonal), és két különböző antiparallel dimerhez tartozó átlagérték (folytonos vonal) esetén vízben.

6.5. Stabilitás jóslása, konformációs entrópia

Fontos kiemelnünk, hogy számításaink során csupán a rendszerek termodinamikai, termokémiai paramétereit vizsgáltuk, az aggregációs folyamat kinetikáját nem. A redős modellszerkezetek vizsgálata során a monomer egységekhez viszonyított relatív nyereségek alapján következtettünk a termodinamikai rendszerek stabilitására, oligomerizáció során például a

szálak összeállásának lehetséges folyamatait, azok végbemenetelének eltérő valószínűségét nem vettük figyelembe.

A fenti eredmények mindegyike azt mutatja, hogy a β -redős szerkezetek keletkezése kedvező folyamat, a redők stabilitása jelentős. Bár munkánk során csak a termodinamikai rendszerek belső entrópiáját számítottuk, a konformációs entrópia értékének megfelelő becslésével a redő teljes entrópiája is megadható. A rendszerek entalpiája, szabadenergiája és belső entrópiája kvantumkémiai számításokból egyértelműen meghatározható érték (a különböző állapotösszegek segítségével), viszont a konformációs entrópiát csupán a Boltzmann féle valószínűségi megközelítést felhasználva becsülhetjük (ld. alábbi példa).

Az általunk számított termodinamikai függvények megváltozása a

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8)$$

egyenlet szerinti kapcsolatban áll egymással. A rendszer teljes szabadentalpiáját ($\Delta\Gamma$) az alábbi összefüggés segítségével írhatjuk fel:

$$\Delta\Gamma = \Delta H - T\Delta(S + \Sigma) \quad (9)$$

ahol $\Delta\Sigma$ a peptid feltekeredéséből származó konformációs, ΔS pedig a belső entrópia változás. Mindkét fenti egyenletből kifejezve ΔH -t, majd egyenlővé téve a kapott kifejezéseket, a rendszer teljes szabadentalpiája a következőképpen lesz számítható:

$$\Delta\Gamma = \Delta G - T\Delta\Sigma \quad (10)$$

Tekintsük példaként egy antiparallel oktaalanin-oktamer (8 darab 8 aminosavat tartalmazó szálból álló) β -redős szerkezet esetét. A fenti eredmények (konvergencia értékek) alapján kapott relatív szabadentalpia nyereség 8 aminosavból álló peptidszál esetén: $9 \times 3,08 + 6 \times 7 \times 3,83 = 188,58$ kcal/mol. A konformációs entrópiát a következőképpen becsülhetjük: legyen a fehérje letekeredett állapotában mind a 64 aminosavnak 3 lehetséges, azonos valószínűséggel megjelenő konformere, ekkor $\Sigma = R\ln(3^{64})$. Ha egy 8 aminosavat tartalmazó szál feltekeredik, akkor ez $\Sigma = R\ln(3^{56})$ -ra csökken, a változás pedig az egész fehérje β -redős szerkezetté történő feltekeredése esetén $\Delta\Sigma = 8 \times R\ln(3^8)$, ahol R az egyetemes gázállandó, értéke: 8,314 J/molK. Ekkor a $T\Delta\Sigma$ tag értéke $T=298,15$ K-en 174,29 kJ/mol, ami 41,70 kcal/mol. A redő teljes szabadentalpiája így $188,58$ kcal/mol $- 41,70$ kcal/mol = 146,88 kcal/mol. E becslés alapján egy 64 aminosavat (és 63 H-kötést) tartalmazó β -redő stabilitása tehát még a konformációs entrópiával korrigált $\Delta\Gamma$ értéket tekintve is igen jelentősnek adódik.

Globuláris fehérjék (amilyenek a szervezetben előforduló enzimek is) stabilitása szobahőmérsékleten 20 kcal/mol körüli érték, így hő közlésével könnyen denaturálhatók. A β -redős szerkezet esetében ez az érték egy nagyságrenddel nagyobb, így megmagyarázható, hogy a szervezetben előforduló fehérjék egy idő után a vizsgált amiloid-szerű egységekké aggregálódnak, a számukra kedvezőbb konformációt veszik fel. A folyamat azonban a kis stabilizációs energiakülönbségekből kifolyólag valószínűleg meggátolható. Az élő szervezetben többek között ezt a célt szolgálják az ún. „chaperonok” vagy dajkafehérjék.

7. Összefoglalás

Munkánk során különböző, a fehérjék aggregációjához köthető betegségek elméleti hátterének mélyebb megértésével foglalkoztunk. Ennek érdekében kvantumkémiai számításokat végeztünk 1-6 aminosav-egységet tartalmazó oligoalaninok dimerizációját, mint az aggregáció első lépését vizsgálva, majd pedig az amiloid szerkezeten belül kialakuló β -redők létrejöttének másik dimenzióját, a szálak összekapcsolódását tanulmányoztuk 1-6 „szálat” tartalmazó monoalanin oligomer modellszerkezeteken. Eredményeink ellenőrzéseképpen, és mert a dialanin-oligomerek az előzőeknél jobban közelítik egy kiterjedt β -redő szerkezetét, e rendszerekre is elvégeztük számításainkat. Hogy a valósághoz közelebbi képet nyerjünk, vizes közegben is vizsgáltuk a redős szerkezetek kialakulását kísérő változásokat.

A számított termodinamikai függvények megváltozásának mértékét figyeltük meg a peptidlánc hosszának, illetve a szálak számának növelése esetén. E függvények viselkedését az antiparallel monoalanin-dimer modelleken elvégzett részletesebb rezgési, majd a rendszer hullámfüggvényén alapuló NBO analízis segítségével magyaráztuk. Annak érdekében, hogy nagyobb rendszerek esetére jósolhatóvá tegyük azok stabilitását, a kapott függvényértékek megváltozását a hozzáadott egységek (H-kötés/szál) száma szerint normáltuk, így állítva elő az egy egység hozzáadása esetén fellépő relatív nyereséget. Összevetve a parallel és antiparallel β -redős szerkezetek stabilitását, mind vákuumban, mind pedig vizes közegben az antiparallel redők mutatkoztak stabilabbnak.

Az általunk elvégzett vizsgálatok egy elméleti jellegű magyarázatot adnak a fehérje aggregátumok amiloid szerkezeteinek kialakulására, illetve azok stabilitására. A jövőbe ezeket az eredményeket is felhasználva talán közelebb juthatunk az aggregációs folyamat visszafordításának lehetőségéhez.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőim mindennemű segítségét, amelyet munkám során nyújtottak: Dr. Perczel Andrásnak a lehetőséget, hogy a csoportjában dolgozzak, a téma felvetését, munkám gondos figyelemmel követését és irányítását, valamint elméleti kémiai érdeklődésem szem előtt tartását; Pohl Gábornak pedig köszönöm a türelmét, az időt és energiát, amit (még a távolból is) okításomra áldozott, és azt, hogy soha egyetlen szakmai kérdésem sem maradt megválaszolatlanul. Köszönet illeti Dr. Jákli Imrét a rengeteg segítségért és odafigyelésért, valamint az NBO program kitartó munkába állításáért, továbbá a Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium és az MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport minden tagját a jó hangulatért és a magas koffeintartalmú beszélgetésekért. Köszönöm Dr. Csizmadia Imre tanár úrnak a dolgozat alapjául szolgáló cikk lektorálását és értékes szakmai tanácsait. Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Szüleimnek és Barátaimnak, hogy lelkesedésem minden mellékhatását elviselték, és hogy mindig számíthattam rájuk.

9. Irodalomjegyzék

- ¹ Eakin, C. M.; Berman, A. J.; Miranker, A. D; *Nature Struct. Mol. Biol.* **2006**, 13, 202-208.
- ² Pohl, G.; Jákl, I.; Csizmadia, I. G.; Papp, D.; Matías, G. F.; Perczel, A.; *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2012**, 14, 1507–1516
- ³ Dobson, C. M., *Nature*, **2005**, 435, 747
- ⁴ Eisenberg, D.; Nelson R.; Sawaya M. R.; Balbirnie, M.; Sambashivan, S.; Ivanova M. I.; Madsen, A. O.; Riekel, C.; *Acc. Chem. Res.*, **2006**, 39(9): 568-575
- ⁵ Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A. O.; Riekel, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D., *Nature*, **2005**, 435, 773
- ⁶ Sawaya, M. R.; Sambashivan, S.; Nelson, R.; Ivanova M. I.; Sievers, S. A.; Apostol, M. I.; Thompson, M. J.; Balbirnie, M.; Wiltzius J. J. W.; McFarlane, H. T.; Madsen, A. O.; Riekel, C.; Eisenberg, D., *Nature*, **2007**, 447, 453
- ⁷ Perczel, A.; Hudáky, P.; Pálffy, V. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 14959
- ⁸ Fejer, S. N.; Csizmadia, I.G.; Viskolcz, B., *J. Phys. Chem.*, **2006**, **A110**, 13325
- ⁹ Street, A. G.; Mayo, S. L., *PNAS*, **1999**, 96, 9074
- ¹⁰ Thompson, J. B.; Hansma, H. G.; Hansma, P. K.; Plaxco, K. W., *J. Mol. Biol.*, **2002**, 322, 645
- ¹¹ Baumketner, A.; Shea, J-E., *Biophysical Journal*, **2005**, 89, 1493
- ¹² Xu, W.; Ping, J.; Li, W.; Mu, J., *J. Chem. Phys.*, **2009**, 130, 164709
- ¹³ Viskolcz, B., Fejer, S. N.; Jensen, S. N. K.; Perczel, A.; Csizmadia, I.G., *Chem. Phys. Lett.*, **2007**, 450, 123.
- ¹⁴ Viskolcz, B., Csizmadia, I. G., Jensen, S. K., Perczel, A., *Chem.Phys.Lett.*, *bírálat alatt*
- ¹⁵ Reed A. E.; Curtiss L. A.; Weinhold F.; *Chem. Rev.* **1988**, 899-926,.
- ¹⁶ Glendening E. D.; Landis C. R.; Weinhold F.; **2011**, *John Wiley & Sons, Ltd. WIREs Comput. Mol. Sci.* 00 1–42 DOI: 10.1002/wcms.51
- ¹⁷ Bartlett, G. J.; Choudhary, A.; Raines, R. T.; Woolfson, D. N., *Nature Chem. Biol.*, **2010**, (6): 615-620
- ¹⁸ Westler W. M.; Lin I.; Perczel A.; Weinhold F.; Markley J. L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**,
- ¹⁹ Alexandrova, A. N.; Boldyrev, A. I.; Zhai, H. J.; Wang, L. S., *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, (250): 2811-2866
- ²⁰ Bedekovits, A.; Kollar, L.; Kegl, T., *Inorganica Chimica Acta*, **2010**, (363): 2029-2045, 2010
- ²¹ Grabowski, S. J., *J. Phys. Org. Chem.*, **2008**, (21): 694-702,

-
- ²² Galabov, B.; Koleva, G.; Schaefer, H. F., III; Schleyer, P. v. R., *J. Org. Chem.*, **2010**, (75): 2813-2819,
- ²³ Veszprémi Tamás, Fehér Miklós, A kvantumkémia alapjai és alkalmazása, 94-101.o., 104-126.o, 161-229.o., Műszaki Könyvkiadó, 2002.
- ²⁴ Mulliken R. S.; *J. Chem. Phys.*, **1955**, 23, 1833, 1841, 2338, 2343
- ²⁵ Johnson, E. R.; Mackie, I. D.; DiLabio, G. A.; *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, 22 1127–1135
- ²⁶ Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, 2, 364
- ²⁷ Chengteh Lee, Weitao Yang and Robert G. Parr, **1988**, *Phys. Rev. B* 37 (2): 785–789
- ²⁸ Balabin, R. M.; *J. Chem. Phys.*, **2010**, 132, 231101
- ²⁹ Simon, S.; Bertran, J.; Sodupe, M.; *J. Phys. Chem.*, **2001**, 105, 4359-4364
- ³⁰ Gaussian 09, Revision B.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2010**
- ³¹ Beke, T.; Csizmadia, I. G.; Perczel, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 5158
- ³² Cancés, E.; Menucci, B.; Tomasi, J.; *J. Chem. Phys.*, **1997**, 107 (8)
- ³³ Kearley, S.K., *J. Comput. Chem.*, **1990**, 11, 1187
- ³⁴ David J. Heisterberg, **1990**, *nem publikált eredmények*, <http://www.ccl.net/cca/software/SOURCES/C/quaternion-mol-fit/index.shtml>
- ³⁵ Jákli, I.; Perczel, A., *J. Pept. Sci.*, **2009**, 15, 738
- ³⁶ NBO 5.9. E. D. Glendening, J. K. Badenhoop, A. E. Reed, J. E. Carpenter, J. A. Bohmann, C. M. Morales, and F. Weinhold (Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, WI, **2011**; <http://www.chem.wisc.edu/~nbo5>)
- ³⁷ T.; Ritter, C.; Adrian, M.; Riek-Loher, D.; Bohrmann, B.; Doeli, H.; Schubert, D.; Riek R, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, 102, 17342
- ³⁸ Viswanathan, R.; Asensio, A.; Dannenberg, J. J., *J. Phys. Chem.*, **2004**, 108, 9205-9212