

β -redős szerkezetek stabilitásának vizsgálata fehérjékben kvantumkémiai módszerekkel



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Szerves Kémiai Tanszék

Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium

Témavezetők:

Pohl Gábor

Prof. Dr. Perczel András

„God used beautiful mathematics in creating the world.”

Paul Dirac

Tartalomjegyzék

1. Kivonat.....	5
2. Abstract.....	6
3. Bevezetés	7
4. Elméleti háttér áttekintése	8
4.1. Kvantumkémiai összefoglaló.....	8
4.2. A sűrűségfukcionál elmélet.....	11
4.3. Termodinamikai függvények – bevezető	15
4.4. Peptidkémiai alapok.....	18
5. Célkitűzések	21
6. A stabilitásvizsgálat elméleti kémiai módszerei	23
6.1. Alkalmazott számítási eljárások.....	23
6.1.1. A megfelelő elméleti szint kiválasztása.....	23
6.1.2. A BSSE kezelése.....	24
6.2. Termokémiai adatok számítása és kezelése	25
6.3. Szerkezeti megfontolások, rezgési analízis	27
6.3.1. β -redős szerkezetek építőelemei	27
6.3.2. β -redő elemeinek rezgési analízise során alkalmazott módszerek.....	28
6.4. Modellezés oldószerben	30
7. Eredmények és következtetések	32
7.1. Oligopeptidek dimerizációja	32
7.1.1. Termodinamikai függvények változása a dimerizáció során.....	32
7.1.2. Antiparallel dimer β -redős szerkezetek rezgési analízise.....	34
7.1.2. Normált termodinamikai függvényértékek a dimerizáció általános jellemzésére	37
7.2. Peptidszálak oligomerizációjának vizsgálata.....	37
7.2.1. Monoalanin oligomerek parallel és antiparallel szerkezeteinek összehasonlítása	37
7.2.2. Antiparallel mono- és dialanin oligomerek stabilitásának összevetése.....	39

7.3. β -redős szerkezetek stabilitása oldószerben	41
7.4. Stabilitás jóslása, konformációs entrópia	42
7.4.1. β -redős szerkezetek stabilitásának jóslása.....	42
7.4.2. A konformációs entrópia szerepe a β -redős szerkezetek stabilitásában.....	43
8. Összefoglalás	45
9. Köszönetnyilvánítás.....	46
10. Irodalomjegyzék.....	47
11. Függelék.....	50

1. Kivonat¹⁴

Az Alzheimer-kór kialakulása amiloid peptidek di-, oligo- és polimerizációjához köthető, amelyekhez hasonló jellegű aggregátumok számos fehérjében előfordulnak függetlenül azok primer szekvenciájától^{1,2}. Ez alapján azt valószínűsíthetjük, hogy az eredeti rendezett szerkezet rendezetlen amiloid formába történő átalakulásának oka a fehérjék gerincváz-szerkezetének tulajdonságaiban keresendő.

A fehérjék gerincének di- és oligomerizációját vizsgálva egy lépéssel közelebb kerülhetünk azok hajtóerejének felderítéséhez, ebből pedig olyan körülmények meghatározásához, amelyek mellett az aggregátumok képződése megállítható, illetve visszafordítható lenne. A di- és oligomerizáció során fellépő entrópiaváltozás vizsgálatához kvantumkémiai módszerekkel teljes szerkezetoptimalást és frekvenciaszámítást végeztünk kis peptid modellszerkezeteken, az M05-2X/6-311++G(d,p)//M05-2X/6-31G(d) elméleti szinten. 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 $[\text{HCO}-(\text{Ala})_2-\text{NH}_2]_m$ ($m=2-6$) modell rendszereket alkalmaztuk.

Oligopeptidek dimerizációját vizsgálva eredményeink azt mutatják, hogy a dimerekben 6 újonnan megjelenő rezgési módus entrópiájároléka kompenzálja a dimer kialakulásából fakadó entrópiacsökkenést. A folyamatok relatív entrópia- és entalpiaváltozása hiperbolikus csökkenést mutat a célszerűen megválasztott egységek számának növekedését tekintve: a peptidek di- és oligomerizációja minden esetben kedvező. A β -redő képződésének e két irányban történő tanulmányozása során a vizsgált termodinamikai függvények relatív megváltozása rendre egy konstans értékhez konvergál a polipeptid láncok számának, illetve hosszának növelésével, így nagyobb rendszerekre nézve e változások jósolhatók. A vizsgált termodinamikai függvények értékeinek megváltozása antiparallel β -redő esetén lépcsőzetes függést mutat az alkotó egységek számától. A 10- és 14 tagú H-kötésű gyűrűkben megjelenő 6 új dimerrezgés azonosítása szolgál erre magyarázattal, ugyanis az ebből adódó különbség okozza e két rendszer eltérő entrópia hozzájárulását a redő teljes entrópiájához.

Az általunk elvégzett kvantumkémiai vizsgálatok egy elméleti jellegű magyarázatot adnak a fehérjék amiloid jellegű szerkezeteinek kialakulására, illetve azok stabilitására. Mivel ezek alapján a betegek szervezetében kimutatható parallel redők stabilitása relatíve csekélynek adódik, arra következtethetünk, hogy már kis zavaró hatás esetén is megállítható lehet az aggregátumok kialakulása, így tehát az Alzheimer-kór a jövőben hatékonyabban kezelhetővé, sőt talán gyógyíthatóvá válna.

2. Abstract¹⁴

The initiation and progression of Alzheimer's disease is coupled to the di-, oligo- and polymerization of the amyloid peptide(s). Amyloid like aggregates of dozens of protein domains were found practically independent of their original primary sequences^{1,2}. Thus, the driving force of the transformation from original to disordered amyloid fold is expected to lie in the protein backbone common to all proteins.

Understanding the entropy changes of the first backbone di- and oligomerization steps would take us closer to predict the circumstances under which the aggregation process could be reversed, resulting in the dissociation of plaques. In order to investigate the entropy change upon di- and oligomerization, full geometry optimizations followed by frequency calculations were performed both on parallel and antiparallel β -pleated sheet model structures of $\text{HCO}-(\text{Ala})_n-\text{NH}_2$, $[\text{HCO}-(\text{Ala})_n-\text{NH}_2]_2$ ($n=1-6$), $[\text{HCO}-\text{Ala}-\text{NH}_2]_m$ and $[\text{HCO}-(\text{Ala})_2-\text{NH}_2]_m$ ($m=2-6$) peptides at the M05-2X/6-311++G(d,p)//M05-2X/6-31G(d) level of theory.

Our results show that during dimerization the enthalpy gain of the supramolecular complex is compensated by the entropy term arising from the 6 newly created vibrational modes of the dimer. Relative entropy and enthalpy both show a hyperbolic decrease with increasing residue number: dimerization and oligomerization is always thermodynamically favoured. Studying these two dimensional types of extension of β -pleated sheets, for larger peptides the relative change in thermodynamic functions is found to be constant, indicating that these values are predictable for larger molecular systems. All thermodynamic functions of the formation of antiparallel β -pleated sheets show a staggered nature along increasing residue number. By identifying and rationalizing the 6 newly emerging dimer vibrational modes in the 10- and 14-membered nanosystems, the difference in the entropy contribution of the dimers (and thus, the multiple stranded sheets) can be explained.

The present theoretical study gives a quantum-level explanation on why peptides and proteins can self transform into an amyloid state. Because of the small value of the variation of Gibbs free energy for the formation of parallel sheets (experimentally shown to be formed), only a minor change in entropy would be needed to compensate the enthalpy gain of di – and oligomerization, which indicates that the search for molecules that hinder or reverse plaque formation is reasonable and feasible effort.

3. 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 előzetes számításakor, 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 számításhoz kémia ezen ágának egyre elterjedtebbé válásával sok, eddig egyáltalán nem, vagy ritkán használt vizsgálati módszer vált általánossá, széleskörűen elérhetővé.

A számításhoz 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 dolgozatban 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. A stabilitás mértékéből pedig következtetni tudunk a folyamat megállításához, majd visszafordításához szükséges destabilizáló hatás nagyságára, a befektetendő energia nagyságrendjére. Az aggregátumokban megjelenő β -redős szerkezetek modelljeinek részletesebb termokémiai vizsgálata lehetővé teszi nagyobb rendszerek tulajdonságainak jóslását is, ezzel biztosítva jelen módszernek a gyakorlatba történő áttételt.

Kimutatták^{1,2}, hogy a fehérjék rendezetlen amiloid jellegű szerkezetbe történő átalakulása gyakorlatilag független azok aminosavsorrendjétől, ennek megfelelően polialanin modellrendszerek segítségével a fehérjék amidgerincének β -redős szerkezetté történő összekapcsolódását tanulmányoztuk munkánk során.

4. Elméleti háttér áttekintése

4.1. Kvantumkémiái összefoglaló³

Ahogy a bevezetésben is említettük, napjainkban a kémia területén egyre szélesebb körben alkalmazzák a kvantumkémiaiát. A kvantumkémia tágabb értelmezésben nem más, mint a kvantummechanika, mint fizikai modell alkalmazása kémiai rendszerekre; két fő ága a magmozgás- és az elektronszerkezet-számítás. Ezt a felosztást tulajdonképpen a Born-Oppenheimer közelítés vonja maga után, amely a mag- és elektronmozgás szétválasztásának lehetőségét biztosítja. Ez a közelítés azon a tényen alapul, hogy az atommagok mozgásának sebessége, az elektronokénál lényegesen nagyobb tömegük miatt elhanyagolhatóan lassú az elektronok mozgásához képest, tehát az elektronmozgás szempontjából a magok mozdulatlanak tekinthetők. Ezután beszélhetünk potenciális-energia (hiper)felületről (PES) amely adott magkoordinátáknál, tehát a molekula adott geometriájánál annak energiáját adja meg.

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 az elsőként említett variációs módszerrel molekulák elektronszerkezetét 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 (adott elméleti szint), illetve a bázis típusa és a báziskészlet nagysága, amelyen a keresett hullámfüggvényt sorba fejtjük. A legtöbb kémiai elem esetén, főként pedig kvantumkémiái módszerekkel egyre gyakrabban vizsgált biomolekulák építőelemeit tekintve a nemrelativisztikus közelítés teljes mértékben helytállóan mondható, az ebből adódó hiba nem számottevő. A variációs eljárás alapján alapuló Hartree-Fock-Roothaan(HFR) – módszer alapeleme a megfelelő bázis segítségével kifejezett Ψ_i egyelektronos pályafüggvények megszerkesztése, majd variálása.

$$\Psi_i = \sum_{\mu=1}^m c_{i\mu} \chi_{\mu} \quad (1)$$

A bázison történő sorfejtés jelentősen egyszerűsíti a variációs eljárást, ilyenkor ugyanis a függvény helyett csupán a lineárkoefficiensek variálandók, így egy klasszikus szélsőérték feladatot kell megoldanunk. Végtelen bázissal a gyakorlatban nem dolgozhatunk, ezért választottunk véges m darab χ_{μ} bázisfüggvényt. Mint tudjuk, a HFR-módszer és a poszt-Hartree-Fock-módszerek is iterációs SCF (Self Consistent Field) eljárások, így a bázisfüggvények megválasztásánál a fő szempont azoknak száma és minősége lesz, a minél gyorsabb konvergencia érdekében. Minthogy számuk korlátozott, nyilvánvalóan igen nagy jelentősége lesz a bázisfüggvények minőségének. Ezek kiválasztásának másik fő szempontja a konvergencia gyors elérése mellett, hogy a Fock-mátrix elemeinek kiszámításához szükséges integrálok, ezek közül is az ún. kételektron-integrálok milyen gyorsan végezhetőek el. A tapasztalatok alapján a bázisfüggvényeket a molekula atomjain centrálják, úgy, hogy helyzetük tükrözze a molekula szimmetriáját, és az atomok gömbszimmetriájának megtartása végett pl. a p-típusú függvényekből három (vagy annak többszöröse) szükséges. Először ún. Slater-típusú („hidrogénszerű”, azaz $\exp(-\zeta r)$ alakú) függvényeket használtak erre a célra, ma viszont számítástechnikai előnyök okán többnyire ($\exp(-\zeta r^2)$ alakú) Gauss-függvényeket alkalmaznak, amelyek számának legalább az elektronok számával kell megegyezni (minimális bázis). Attól függően, hogy hány primitív Gauss-függvényt „helyezünk” az egyes törzs- vagy vegyértékelektronokra, illetve hogy alkalmazunk-e polarizációs, esetleg diffúz függvényeket, több, egyre jobb minőségű báziskészletet különböztethetünk meg. Ezek továbbfejlesztése a beépített polarizációs függvényeket tartalmazó, az egyre nagyobb mellékkvantumszámú pályákat többszörösen figyelembe vevő korreláció-konzisztens bázisrendszer.

Ami az adott elméleti szinttel kapcsolatos közelítéseket illeti, a HF-módszer súlyos hibája az egyelektron-közelítés, azaz, hogy az elektronok kölcsönhatását egy átlagos elektrontaszítási potenciállal vesszük figyelembe, holott ez a kölcsönhatás minden időpillanatban változik, az elektronok mozgása korrelált. A HF-limit és az egzakt (nem relativisztikus) energia közötti különbséget nevezzük ebből adódóan korrelációs energiának, melynek kezelésére számos eljárás létezik. Például ha determináns-hullámfüggvény helyett végtelen függvény-sort használnánk, akkor nem követnénk el hibát. Erre a célra a következő CI (Configurational Interaction)-sorfejtést alkalmazzák. A sorfejtéshez először is új determinánsokat (Φ_i) generálunk úgy, hogy az eredeti Φ_i^a determinánsban az i -edik betöltött egyelektronos φ_i függvényt kicseréljük az a -edik üres virtuális pályára (egyszeresen gerjesztett determináns), azután ezt két (kétszeresen gerjesztett

determináns), majd az összes elektronnal megtesszük. Így végtelen sok n -ed rendű determináns képezhető, melyek az egyelektron-függvények ortogonalitásából következően szintén ortogonálisak, így ezeken az n -elektronos egzakt hullámfüggvény sorbafejthető:

$$\Psi = \sum_{i=1}^{\infty} C_i \Phi_i \quad (2)$$

Az így kapott Ψ hullámfüggvény a konfigurációs kölcsönhatás (CI) hullámfüggvény. A gyakorlatban természetesen véges bázist használunk, így a CI-sorfejtés is véges; egy adott véges bázis esetén a teljes sort Full CI-nek (FCI) nevezzük. A C_i koefficiensek optimalizálására variációs elvet használunk. A korrelációs energiát perturbációs módszerrel is számíthatjuk, ezek az Moller-Plesset, MP_n -módszerek, ahol n a perturbáció rendjét hivatott jelölni. A harmadik eljárás a korrelációs energia figyelembe vételére az ún. Coupled Cluster (CC) - módszer, amikor is a hullámfüggvény sorfejtését a következő alakban írjuk:

$$\Psi = (1 + \hat{C}_1 + \hat{C}_2 + \dots) \Phi_0 \quad (3)$$

ahol $\hat{C}_1$ operátor előállítja Φ_0 -ból az összes egyszeresen gerjesztett konfigurációt, $\hat{C}_2$ az összes kétszeresen gerjesztettet, stb. A méretkonzisztencia megőrzése érdekében a gerjesztett konfigurációkat előállító operátorokat exponenciális alakra hozzuk (így a kitevők szorzáskor összeadódnak), és az exponenciálist sorba fejtjük:

$$\Psi = e^{\hat{T}} \Phi_0 = \left(1 + \hat{T} + \frac{1}{2} \hat{T}^2 + \frac{1}{3!} \hat{T}^3 \dots \right) \Phi_0 \quad (4)$$

$$\hat{T} = \hat{T}_1 + \hat{T}_2 + \hat{T}_3 + \dots \quad (5)$$

Itt $\hat{T}$ az összes gerjesztést előállítja, az alsó index pedig azt jelzi, hogy hány elektront gerjesztettünk. Attól függően, hogy a sorfejtésben hány-szoros gerjesztéseket vesszünk figyelembe, beszélhetünk CCD ($\hat{T}_2$), $CCSD$ ($\hat{T}_1 + \hat{T}_2$), stb. módszerekről.

A kvantumkémiai számítások bonyolultságából következik, hogy elvégzésük számítógép nélkül elképzelhetetlen. Éppen ezért mára számos ilyen jellegű számításra alkalmas programcsomagot fejlesztettek ki, mint például a manapság leggyakrabban alkalmazott *Gaussian programcsomag*⁴, valamint a *MOLPRO*, a *CFOUR*, a *TURBOMOL*, és még sorolhatnánk. Ezek segítségével a megfelelő elméleti szint és bázis kiválasztását követően viszonylag egyszerűen és hatékonyan végezhetünk pontos, a kísérleti eredményekkel összhangban álló számításokat.

4.2. A sűrűségfunkcionál elmélet³

Mint ismeretes, egy rendszert leíró hullámfüggvénynek nem tulajdonítunk konkrét fizikai jelentést, viszont abszolútértékének négyzete adja az igen szemléletes valószínűségi értelmezést. A következő

$$\Psi^*(1,2,\dots,n)\Psi(1,2,\dots,n)d\tau \quad (6)$$

kifejezés annak valószínűségét adja meg, hogy az 1. részecske az r_1 és r_1+dr_1 és a 2. részecske az r_2 és r_2+dr_2 , ..., az n -edik az r_n és r_n+dr_n térrészben található ($d\tau$ az összes részecske összes térbeli-, r_i az i -edik részecske összes térbeli koordinátáját jelöli). Annak a valószínűsége, hogy egy elektront találunk a tér egy pontja körüli infinitezimálisan kis térfogatban:

$$\Psi^*(1)\Psi(1)dr \quad (7)$$

Ha a rendszerünk több elektront tartalmaz, egy elektron tartózkodási valószínűségét a következő formula szolgáltatja (a többi elektron tartózkodási valószínűségét összegezzük, azaz integrálhatunk a teljes térre):

$$p_1 = \iint_{-\infty-\infty}^{\infty\infty} \dots \int_{-\infty}^{\infty} \Psi^*(1,2,\dots,n)\Psi(1,2,\dots,n)dr_2 dr_3 \dots dr_n \quad (8)$$

Ezek a p_i valószínűségek az egyes elektronokra megegyeznek azok megkülönböztethetlensége miatt. Ebből adódóan annak a valószínűsége, hogy az n -ből *egy* elektront találunk az adott térrészben az egyes megtalálási valószínűségek összege:

$$\rho(r) = n \iint_{-\infty-\infty}^{\infty\infty} \dots \int_{-\infty}^{\infty} \Psi^*(1,2,\dots,n)\Psi(1,2,\dots,n)dr_2 dr_3 \dots dr_n \quad (9)$$

A $\rho(r)$ -függvényt nevezzük *elektronsűrűségnek*. Az elektronsűrűség 3 változós térbeli függvény, amelyet ha integrálunk a 3 változó szerinti egész térre, megkapjuk az elektronok számát:

$$\int \rho(r) dr = n \quad (10)$$

Azt mondhatjuk, hogy egy molekula elektronsűrűsége attól függ, hogy az elektronokra milyen $V(r)$ külső potenciál hat; az n darab elektron eloszlását $V(r)$ egyértelműen meghatározza. Ez a megállapítás viszont fordítva is igaz: adott elektronsűrűség $V(r)$ -t egyértelműen megadja. Így tehát ha létezik hozzárendelés a külső potenciál és a rendszer hullámfüggvénye között, illetve

a hullámfüggvény és az elektronsűrűség között (ld. fenti levezetést), akkor ez a hozzárendelés invertálható: létezni kell egyértelmű hozzárendelésnek az elektronsűrűség és a külső potenciálok között is. Ennek igen lényeges következménye az az állítás, hogy egy rendszer alapállapotú energiája meghatározható az elektronsűrűség ismeretében, tágabban értelmezve a rendszer egy mérhető $\mathbf{A}$ tulajdonsága az alapállapot elektronsűrűségének egyértelmű funkcionálja, $\mathbf{A} = \mathbf{A}[\rho]$. E tétel bizonyítása Walter Kohn (1998, Kémiai Nobel-díj) és Pierre C. Hohenberg nevéhez fűződik, ezért első Hohenberg-Kohn tételnek nevezzük.

Az első Hohenberg-Kohn tétel lehetőséget kínált arra, hogy az eddigi hullámfüggvényen alapuló számításokat egy olyan módszer váltsa fel, melynek alapja az elektronsűrűség. Ennek az előbbiekkel szembeni nagy előnye, hogy az elektronok számától függetlenül az elektronsűrűség-függvény mindig 3 változós marad, így számításigénye jelentősen kisebb a hullámfüggvény módszerekénél, emellett pedig igen pontos (a kísérleti értékekkel jól egyező) eredményeket szolgáltat. Hátránya viszont, hogy a módszer hibája nem szisztematikus, tehát nem jósolható. 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

$$E[\tilde{\rho}] \geq E_0[\rho_0] \quad (11)$$

ahol E_0 az alapállapot energiája és ρ_0 az adott rendszer alapállapotának elektronsűrűsége. Ez alapján keressük az energiafunkcionál minimumát (az alapállapot elektronsűrűségét), a részecskeszám állandóságát előíró mellékfeltétel mellett. Ezt a számítási eljárást alkalmazza a *sűrűségfunkcionál elmélet* (DFT, *Density Functional Theory*). A DFT-módszer alkalmazása során egy molekulát a megszokottól eltérő módon úgy építünk fel, hogy az N elektront tartalmazó „elektronfelhőbe” helyezzük az atommagokat, és ezek hatását az elektronokra, mint külső potenciált tekintjük.

Az energia várható értéke a következő alakban írható:

$$\begin{aligned} E[\rho] &= \langle \Psi[\rho] | \hat{H} \Psi[\rho] \rangle = \langle \Psi[\rho] | \hat{T} \Psi[\rho] \rangle + \langle \Psi[\rho] | \hat{V}_{ee} \Psi[\rho] \rangle + \langle \Psi[\rho] | \hat{V}_{ne} \Psi[\rho] \rangle \\ &= T[\rho] + V_{ee}[\rho] + V_{ne}[\rho] \end{aligned} \quad (12)$$

ahol Ψ a rendszer hullámfüggvénye, $\hat{H}$ a Hamilton-operátor, $\hat{T}$ a kinetikus energia operátora, $\hat{V}_{ee}$ az elektron-elektron taszítási, $\hat{V}_{ne}$ a mag-elektron vonzási potenciális energia operátor; a $T[\rho]$, $V_{ee}[\rho]$ és $V_{ne}[\rho]$ pedig rendre ezek energijárulékait jelölik. V_{ne} külső potenciál a következőképpen fejezhető ki:

$$V_{ne} = - \sum_{i=1}^n \sum_{\alpha=1}^N \frac{Z_{\alpha} e^2}{r_{i\alpha}} = \sum_{i=1}^n v(r_i) = n v(r) \quad (13)$$

Ezek alapján:

$$V_{ne}[\rho] = \int \Psi^*(1, \dots, n) \Psi(1, \dots, n) \sum_i v(r_i) dr_1 \dots dr_n = \int \rho(r) v(r) dr \quad (14)$$

Az energiafunkcionál alakja így:

$$E(\rho) = F[\rho] + \int \rho(r) v(r) dr \quad (15)$$

ahol $F[\rho]$ az ún. Hohenberg-Kohn funkcionál:

$$F[\rho] = T[\rho] + V_{ee}[\rho] \quad (16)$$

$F[\rho]$ független a külső potenciáltól, tehát azonos részecskeszámú rendszerekre mindig ugyanaz. A $V_{ee}[\rho]$ elektrontaszítási potenciál is felbontható két további tagra: a klasszikus elektrontaszítási és a nemklasszikus kicserélődési potenciálra. A második Hohenberg-Kohn tételben felvázolt variációs probléma egzakt megoldásának egyetlen akadálya, hogy $F[\rho]$ alakja nem ismert. Ezen belül is a $V_{ee}[\rho]$ tag számítása a problémás, erre eddig még csak közelítő formulák léteznek, $T[\rho]$ egzaktul számolható.

Ennek kiküszöbölésére Kohn és Lu J. Sham kidolgozott egy eljárást, mely során egy olyan rendszert „használunk”, amelyben az elektronok között semmilyen kölcsönhatás nincsen, de alapállapotának elektronsűrűsége megegyezik a kölcsönható rendszerével (nyilván a külső potenciál a két esetben más lesz). E rendszer Schrödinger-egyenlete ezután egyelektronos egyenletekre esik szét, így pontosan leírható egy determináns hullámfüggvénnyel, és az ebben levő egyelektron-függvényekkel a sűrűség megadható:

$$\rho = \sum_{i=1}^n |\varphi_i|^2 \quad (17)$$

A kölcsönható rendszer kinetikus energiafunkcionálját közelíthetjük a nem kölcsönható rendszerével ($T_s[\rho]$), a kettő közti különbség (amely tartalmazza az elektronkorreláció egy részét) pedig összevonható a fenti kicserélődési potenciális energijárulékkaal, így $F[\rho]$ a következő alakot veszi fel:

$$F[\rho] = T_s[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (18)$$

ahol $J[\rho]$ jelöli $V_{ee}[\rho]$ -ből a klasszikus Coulomb-tagot, $E_{xc}[\rho]$ pedig az ún. kicserélődési-korrelációs potenciál. A módosult variációs feladatban megjelenő $\delta E_{xc}[\rho]/\delta\rho(r)$ tag az egyetlen, nem egzaktul számítható tag. A probléma oly módon egyszerűsödhet, ha azt vizsgáljuk meg, hogy a φ_i egyelektronos függvények hogyan választandók meg, hogy az energia várható értéke minimális legyen. A variációs elvből következően egy, a Hartree-Fock problémával analóg feladatot kell megoldanunk, amelyből a „kanonikus” Kohn-Sham pályákat kaphatjuk a megszokott SCF iterációs algoritmust használva. Ez az eljárás a HF egyenletekkel ellentétben semmilyen közelítést nem alkalmaz, teljesen egzakt, viszont a kapott KS-pályákhoz még annyi fizikai kép sem rendelhető, mint a HF-módszerből kapott pályákhoz. Az egyetlen mennyiség, amelynek van fizikai jelentése, az elektronsűrűség, amely a KS-pályák segítségével számítható (17) alapján, ebből pedig a rendszer energiája meghatározható.

A DFT-módszerek legnagyobb hiányossága, hogy az E_{xc} kicserélődési-korrelációs funkcionál alakja nem ismert. Ennek becslésére az elmélet kidolgozása óta több próbálkozás is történt, ezek közül tekintsük át a legfontosabbakat:

- 1) Először válasszuk szét a E_{xc} -t egy kicserélődési és egy korrelációs tagra:

$$E_{xc}[\rho] = E_x[\rho] + E_c[\rho] \quad (19)$$

Az $E_x[\rho]$ alakját homogén elektrongázra már Dirac levezette 1930-ban, ezt alkalmazza az elektronsűrűség lokális közelítésén alapuló LDA (Local Density Approximation) módszer. Ezt nyílt héjú rendszerekben lokális spinsűrűség-közelítésnek (LSDA, Local Spin Density Approximation) nevezik.

- 2) Mivel az elektronsűrűség közel sem tekinthető homogénnek, valamilyen módon tekintetbe kell venni az inhomogenitását. Ezt többek között úgy tehetjük meg, ha formálisan sorba fejtjük a funkcionált a sűrűség szerint, vagyis figyelembe vesszük a funkcionáloknak a sűrűség deriváltjaitól való függését is. Az így kapott formulákat gradienssel korrigált funkcionáloknak nevezzük. Ezek közül a leggyakrabban használtak a C. Lee, W. Yang és R. G. Parr⁵, valamint a Y. Wang és J. P. Perdew által kifejlesztett korrelációs funkcionálok.
- 3) Az ún. hibrid módszerek alapja az, hogy a HF-elmélet egyelektronos modellje egzakt formulát szolgáltat a kicserélődési funkcionálra. E módszerekben E_{xc} számítása a HF kicserélődési és a DFT kicserélődési-korrelációs funkcionál valamilyen kombinációjának segítségével történik. Ilyen Becke háromparaméteres hibrid funkcionálja, amelyben a Lee-

Yang-Parr-féle korrelációs funkcionált felhasználva kapjuk a ma, főleg nagy rendszerek kezelésében igen népszerű B3LYP funkcionált. Hibrid funkcionál még pl. a Y. Zhao, E. Schultz és D. G. Truhlar által megalkotott M05-2X⁶ funkcionál, amelyet főként diszperziós kölcsönhatást tartalmazó rendszerekhez és termokémiai számításokhoz fejlesztettek ki, és amellyel a jelen dolgozat számításainak nagy részét végeztük.

- 4) Egy másik lehetőség, hogy egy nagyon pontos hullámfüggvény alapú módszer (pl. CCSD(T)) segítségével számított elektronsűrűségből kiindulva keresünk olyan „nem kölcsönható” rendszert, amely ugyanazt a sűrűséget szolgáltatja, és így következtetünk E_{xc} -re.

A DFT-módszert manapság igen széleskörűen alkalmazzák, főleg nagyméretű, illetve bonyolult szerves kémiai, és kisebb biológiai rendszerek esetében. Számításigénye a HF-módszeréhez közeli (az SCF algoritmus alkalmazhatóságából kifolyólag), a DFT-vel kapott eredmények pontossága az MP2 módszerekéhez hasonló. A bázis méretére kevésbé érzékeny, mint a poszt-HF-módszerek, mivel az elektronkorrelációt implicit módon foglalja magában, tehát itt nincs szükség virtuális pályák számítására. A módszer nagy hátránya, hogy mivel a kicserélődési-korrelációs funkcionál alakja egyáltalán nem ismert, nem tudjuk, hogy a közelítő funkcionálok a valódihoz képest „mennyire jó” eredményeket adnak. Ebből adódóan a módszer hibája nem becsülhető, az egyes funkcionálok „használatosságát” csakis a kísérleti eredményekkel való egyezés igazolhatja. Bár a DFT-módszerek a beépített empirikus paraméterek (általában 1-3 darab) miatt alapvetően nem tekinthetők *ab initio* módszereknek, jelentős az eltérés az esetenként 30-40 paramétert is tartalmazó félempirikus módszerektől, tekintve, hogy maga a sűrűségfunkcionál elmélet elvileg egzakt eredményeket szolgáltat, csupán az ominózus E_{xc} funkcionál pontos kifejezése nem ismert még. A DFT pontosságáról és alkalmazhatóságáról a dolgozatban bemutatott téma tükrében részletesebben is lesz szó a későbbiekben.

4.3. Termodinamikai függvények - bevezető⁷

A(z axiomatikus) termodinamika első axiómája szerint egy egyensúlyban lévő egyszerű termodinamikai rendszer állapota egyértelműen leírható $K+2$ változó segítségével, ahol K a rendszer kémiai komponenseinek számát jelöli, tehát a rendszernek $K+2$ szabadsági foka van. Azokat a mennyiségeket, amelyek függvényében egy adott termodinamikai rendszer összes tulajdonsága megadható, *állapotváltozóknak* nevezzük. A függvények pedig, amelyek értékét ezek a változók egyértelműen meghatározzák az *állapotfüggvények*. A rendszer egyensúlyát meghatározó kényszerfeltételektől függően más-más állapotfüggvények más-más állapotváltozók függvényében

írják le egy adott rendszer tulajdonságait. A termodinamika második axiómája kimondja, hogy létezik az extenzív paramétereknek egy *entrópiának* nevezett függvénye, amely minden egyensúlyi állapotban értelmezhető és ott maximális értéket vesz fel izolált összetett termodinamikai rendszerek esetén, ha nem áll fenn semmilyen kényszerfeltétel. Az entrópiafüggvény változói a belső energia (U), a térfogat (V), és az egyes komponensek anyagmennyiségei (n_i), tehát extenzív mennyiségek:

$$S = S(U, V, n_1, \dots, n_k) \quad (20)$$

A harmadik axióma értelmében az entrópia additív a rendszer részei felett, folytonos, differenciálható, és a belső energiának szigorúan monoton növekvő függvénye. Ezek alapján az entrópiafüggvény invertálásával kaphatjuk az

$$U = U(S, V, n_1, \dots, n_k) \quad (21)$$

energiafüggvényt, amelynek megadása egyenértékű S megadásával, ugyanúgy leírható vele a rendszer összes egyensúlyi állapota, emiatt (20)-t és (21)-t is *fundamentális egyenleteknek* nevezzük. Az energiafüggvény teljes differenciálja az alábbi formában írható (differenciális fundamentális egyenlet):

$$dU = \left(\frac{\partial U}{\partial S}\right)_{V,n} dS + \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_{S,n} dV + \sum_{i=1}^K \left(\frac{\partial U}{\partial n_i}\right)_{S,n_{j \neq i}} dn_i = TdS - PdV + \sum_{i=1}^K \mu_i dn_i \quad (22)$$

A fenti additivitásból következik matematikailag (Euler tétele homogén elsőfokú függvényekre) a Gibbs-Duhem egyenlet, amely kapcsolatot teremt az intenzív mennyiségek között, emiatt tehát egy intenzív változókkal jellemzett termodinamikai rendszer maradéktalan leírásához $K+1$ adat is elegendő:

$$-SdT + VdP - \sum_{i=1}^K n_i d\mu_i = 0 \quad (23)$$

Ha egy olyan rendszert tekintünk, amely izentropikus, nyomása állandó, valamint a benne levő kémiai komponensek anyagmennyisége sem változhat, akkor abban az egyensúly jellemzésére a következő, *entalpiának* (angol néven: Helmholtz energy) nevezett függvény használható:

$$H = H(S, P, n_1, \dots, n_k) \quad (24)$$

amelynek definícióját a következőképpen adhatjuk meg:

$$H = U + PV \quad (25)$$

Ha rendszerünkben a térfogatot, a hőmérsékletet és az anyagmennyiségeket tartjuk állandó értéken, akkor az egyensúlyt a szabadenergia függvénye írja le:

$$F = F(T, V, n_1, \dots, n_k) \quad (26)$$

amelynek definíciója:

$$F = U - TS \quad (27)$$

A vegyész számára gyakorlati szempontból talán legfontosabb energia jellegű állapotfüggvény a *szabadentalpia*, angol nevén Gibbs free energy, amely az állandó anyagmennyiségű, nyomású és hőmérsékletű, laboratóriumban a legkönnyebben megvalósítható rendszer tulajdonságainak leírására szolgál:

$$G = G(T, P, n_1, \dots, n_k) \quad (28)$$

amelyet a következő egyenlet definiál:

$$G = U - TS + PV = F + PV = H - TS \quad (29)$$

Egy rendszer termodinamikájának jellemzéséhez általában e függvények makroszkópikus megváltozását használjuk fel, tehát a fenti egyenlet ez esetben a következőképpen alakítható át:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (30)$$

Egyensúlyban a H , G , F potenciálfüggvények mindig minimum értéket vesznek fel, valamint mindegyikük előállítható az U függvényből részleges Legendre-transzformációval.

Fontos megjegyezni, hogy míg az entrópiaskálának definiálható abszolút nulla pontja (ez a nulla Kelvin fokos hőmérséklethez tartozó S érték – negyedik axióma), addig az energia jellegű mennyiségek (H, F, G) skálájának nulla pontja önkényesen választott, mégpedig az ún. referenciaállapotokhoz kapcsoltan. Egy kémiai elemnek a 25 °C-on (298,15 K-en) stabil allotróp módosulatának képződéséhez mindig zérus értékű képződési entalpia tartozik. Gyakorlati okokból kifolyólag kötjük az energiaskála nulla pontját a standard képződési entalpiához (jele: $\Delta_f H^\circ$), nevezetesen azért, mert állandó nyomáson laboratóriumi körülmények között könnyebben kivitelezhető egy reakció lejátszódását kísérő hőeffektusok követése, mint például állandó térfogaton.

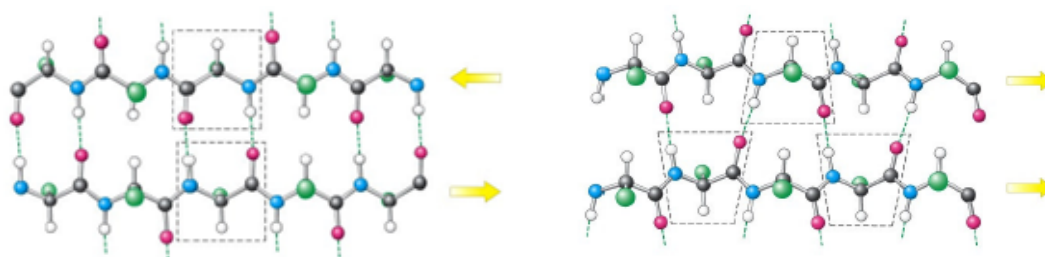
A fent bemutatott függvényeket nemcsak makroszkópikus tulajdonságok vizsgálatából nyerhetjük, hanem kifejezhetők mikrorendszerek lehetséges állapotainak figyelembe vételével is a statisztikus mechanika összefüggéseit felhasználva. Ezen elmélet keretei között az entrópiának egy új, általános definíciója adódik:

$$S = k \cdot \ln W \quad (31)$$

amelyben a W a Boltzmann által bevezetett ún. termodinamikai valószínűség, k pedig a Boltzmann-állandó ($1,38065 \cdot 10^{-23}$ J/molK). W definíciószerűen az azonos energiaértékkel megjelenő makroállapotot megvalósító mikroállapotok számát jelöli. A statisztikus mechanikában szintén felírhatók a fenti fundamentális egyenletek és kifejezhető az egyes potenciálfüggvények alakja.

4.4. Peptidkémiai alapok⁸

A fehérjék polipeptidláncokból felépülő, biológiai funkcióval rendelkező makromolekulák. A polipeptidek α -aminosav monomerekből álló lineáris polimerek, melyekben az egymást követő aminosavak karboxilcsoportja és aminocsoportja között kialakuló peptidkötéssel kapcsolódnak a monomer egységek. A fehérje biológiai funkcióját térszerkezete és aminosav-összetétele határozza meg. A fehérjét alkotó aminosavak kapcsolódási sorrendje jelenti azok elsődleges szerkezetet, másodlagos szerkezetük pedig a peptidláncok periodikus rendezettségéből adódik. Alapvetően két ilyen periodikus szerkezetet különböztetünk meg: az α -hélixet, és a β -redőzött réteget. Az egyes peptidszálak irányultságától függően beszélhetünk *parallel*, illetve *antiparallel* β -redőről, amint azt az alábbi ábrán láthatjuk.



1. ábra: Antiparallel (balra) és parallel (jobbra) β -redős szerkezetek⁹

Az 1. ábrán a sárga nyilak a szálak irányultságát jelzik (N-terminálistól C-terminálisig), a szaggatott vonallal jelölt keretek egy aminosav-egységet mutatnak. Mindkét szerkezet esetén kialakulnak H-kötések két szomszédos szál között, antiparallel redőben 10 illetve 14 tagú ún. pszeudogyűrűk

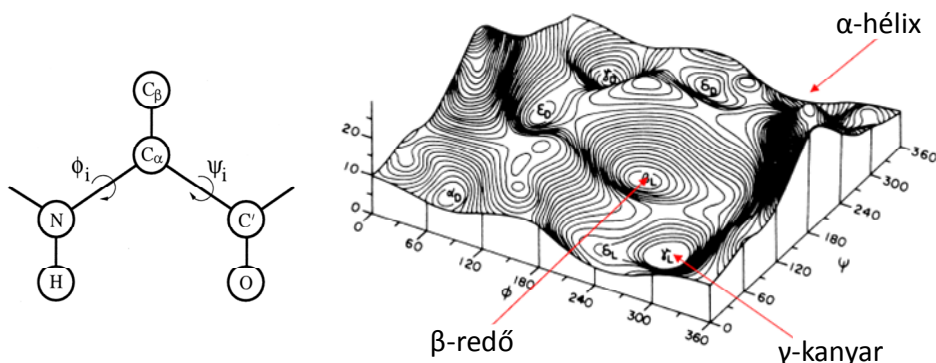
váltakoznak, míg parallel redő esetén mindig 12-tagú H-kötéses gyűrűk képződnek. Ezek stabilitása jelentősen befolyásolja a redő tulajdonságait, amint azt a későbbiekben látni fogjuk. A másodlagos szerkezeti elemek egymáshoz viszonyított, különböző gyenge kötőerők által meghatározott helyzete adja a fehérje harmadlagos szerkezetét, natív konformációját. A rendezett illetve rendezetlen részek keveredéséből főként szálas (fibrilláris, pl. selyem, kollagén) és gömbszerű (globuláris, pl. enzimek) szerkezetek alakulnak ki. A natív konformációt rögzítő erők legnagyobb részt a következők: kovalens kötések (két cisztein aminosav között kialakuló diszulfidhíd), másodlagos kötőerők, mint például a már említett H-kötés, van der Waals diszperziós kölcsönhatások, illetve elektrosztatikus hatások. E konformáció megváltozása lehet reverzibilis és irreverzibilis, számos betegségnek az utóbbi jelenség az okozója. A negyedleges szerkezet a több polipeptidláncból álló fehérjékben az egyes láncok összekapcsolódásának módját, így az összetett fehérjék teljes térszerkezetét írja le.

A fehérjék szerkezetét és dinamikáját több évtizede sikeresen vizsgálják spektroszkópai és diffrakciós módszerekkel, ám feltekeredésük módját eddig nem sikerült értelmezni. Ehhez nyújt egyre értékesebb támogatást napjainkban a számítási kémia: egyszerű modellrendszereken végzett *ab initio*, illetve félempirikus kvantumkémiai számítások és molekulamechanikai szimulációk segítik a fehérje térszerkezet kialakulásának, ezzel pedig a funkcionalitásnak a mélyebb megértését. Mivel egy valódi fehérje vizsgálata sajnos ma még nem kivitelezhető kvantumkémiai programcsomagok segítségével, ezért kénytelenek vagyunk csupán bizonyos részeket, az azok közötti lényeges kölcsönhatásokat modellezni.

Keressük meg azt a legkönnyebben kezelhető peptidrészletet, amelynek vizsgálata mégis hasznos és főként hiteles információkkal szolgálhat a fehérje szerkezetének kialakulását tekintve. A fehérjék feltekeredése (folding) a mai tudásunk szerint nincs meghatározva a genetikai kódban, tehát feltételezhetjük, hogy a primer szekvencia valamilyen következményeként áll elő. Ennek tükrében érdemes megvizsgálni, hogy hogyan, milyen kölcsönhatások közreműködésével alakul ki adott konstitúciónál a fehérjemolekulák másodlagos, majd végső szerkezete, ennek modellezésére pedig első lépésként célszerű a peptidláncok gerincének konformációit tanulmányozni. A peptid gerinc optimális helyettesítésére jó választás a legkisebb királis aminosavból, L-alaninból felépített polimer, amely tulajdonképpen egy-egy szénatomon át kapcsolódó amidcsoportok sorozata. Így a számításokat nem nehezíti az oldalláncok bonyolult elektronszerkezetének kezelése, viszont a gerinckonformációt tekintve jól használható információkat nyerhetünk. Az amidkötés π -elektron delokalizációból adódó merevsége következtében a polipeptidlánc három egymást követő kötés közül csak kettő mentén csavarodhat el: az α szénatomokat az egyik amidcsoport

nitrogénatomjával és a másik karbonil-szénatomjával összekapcsoló σ -kötések mentén, az amidcsoport belső C – N kötése merev.

A fenti megfontolásokat figyelembe véve kézenfekvő volt a lánc legegyszerűbb részletének, egy diamid résznek a vizsgálata¹⁰, amelyen a lehetséges konformációkat tanulmányozva következtettek a másodlagos szerkezetek tulajdonságaira, ezzel reprodukálva a kísérleti α - és β szerkezetek létezését.

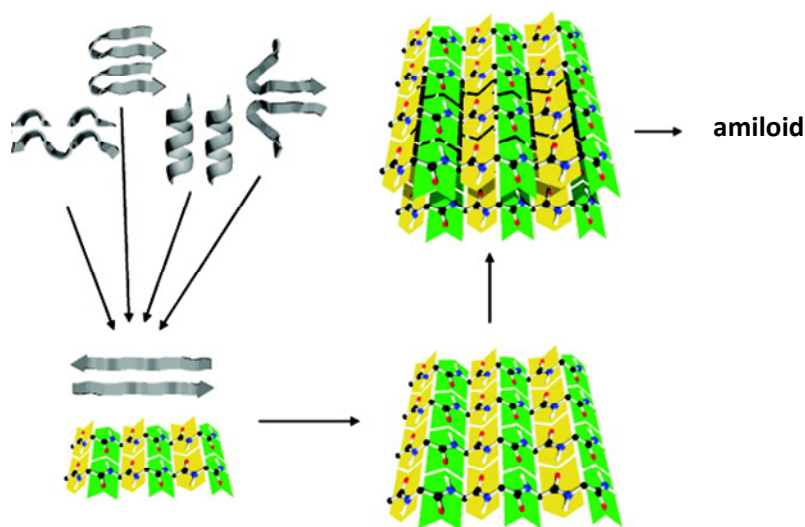


2. ábra: Diamidrészlet és jellemző konformációi a Ramachandran térképen⁹

A 2. ábrán az $E[\Phi, \Psi]$ Ramachandran térképen a D- és L-aminosavak (For-L/D-Gly-NH₂ és For-L/D-Ala-NH₂) diamidjainak jellemző konformációi láthatók a kilenc lokális minimumhoz rendelve. A bal oldali rajz mutatja azt a két említett σ -kötés körül definiálható Φ és Ψ szöget (0° -tól 360° -ig terjedően), amelyek mentén elvileg szabad rotáció lehetséges. Részletes kvantumkémiai és molekulamechanikai vizsgálatokból kiderült¹⁰, hogy L-aminosavak esetén négy kedvező konformáció valósul meg: a legstabilabb, a γ -kanyar, az α -hélix, a β -redő és az ϵ_L szerkezetet eredményező szögállás. Ezek közül a leggyakrabban vizsgált a két középső, amelyek a szögek következő értékeinél alakulnak ki: $\Phi = 40^\circ, \Psi = 320^\circ$ (β -redő) és $\Phi = 130^\circ, \Psi = 120^\circ$ (α -hélix). Ha az amidcsoportok a fenti konformációknak megfelelően helyezkednek el, akkor tudnak a legkedvezőbb módon kialakulni a H-kötések a N-atomokhoz kapcsolódó H-atomok és a közeli karbonil csoportok O-atomjai között. Az α szerkezetből (L-aminosavak esetén) mindig jobbmenetes hélix alakul ki, melyben az egymás felett elhelyezkedő, minden negyedik egymás utáni aminosavrészlet között alakul ki H-kötés, míg az oldalláncok a henger palástjához képest „kifelé” állnak, ez a mélyebb energiájú konformáció. β esetben a redőzött szalaghoz hasonló elrendezésű peptidszálak már elég közel kerülhetnek egymáshoz, hogy stabil H-kötés rendszert alakítsanak ki a szemben lévő amid és karbonil csoportok, a szálak irányultságától függően a már említett 10 és 14 (antiparallel), valamint a 12 tagú (parallel) H-kötésű pszeudogyűrűket létrehozva.

5. Célkitűzések

Az Alzheimer-kór egy, a fehérjék konformációjának megváltozása miatt létrejövő betegség, amelynek kialakulása amiloid peptidek képződéséhez és aggregációjához köthető. Már enyhén megváltozott sejtbeli körülmények között is felvehet a fehérje egy alternatív másodlagos szerkezetet, így egy többszálú β -redős réteg alakulhat ki, amely ezután tovább növekszik, és makroszkopikus méretű ún. plakkokat^{11,12,13} hoz létre a szervezetben. Ezek az aggregátumok a peptidlánc hosszától és annak aminosav-összetételétől függetlenül alakulnak ki¹. Az ilyen β -redős szerkezetek gyakran megjelennek az amiloid peptidek fonalszerű aggregátumaiban is, illetve más fehérjék vizsgálata során is megfigyelték őket. Létezik egy elmélet arra nézve, hogy amennyiben meg lehetne akadályozni az így kialakult plakkok további növekedését, vagy pedig az aggregátum szerkezete valamilyen módon szétzilálható lenne, az Alzheimer-kór előrehaladása megállíthatóvá, mi több, talán visszafordíthatóvá válna. A plakk-képződés megakadályozásával már számos kutatócsoport foglalkozott, de megoldás a problémára eddig még nem született. A jelen munkában bemutatott elméleti jellegű kutatás, a β -redős szerkezetek stabilitásának beható termodinamikai vizsgálata e cél megvalósításához juttat bennünket közelebb.



3. ábra: Amiloid szerkezet képződése megváltozott konformációjú peptidszálakból²

Mivel e β -redős szerkezetek képződése a primer szekvenciától nem mutat függést, ezért 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 kialakításának lehetőségéhez, amelyek az aggregációs folyamat leállításához vezetnek.

A fent említett di- és oligomerizációs folyamatok termokémiájának, elsősorban entrópiaváltozásainak, illetve a kiindulási anyagok és a képződött aggregátumok rezgési módusainak kvantumkémiai úton történő vizsgálata volt a dolgozat alapjául szolgáló cikk¹⁴, így a dolgozatban ismertetett munka célja. Modell rendszerként alaninból felépített oligopeptideket használva a kialakuló β -redőzött rétegek számos tulajdonságára, főként pedig stabilitásuk mibenlétére adhatunk magyarázatot. A Gaussian 03 programcsomag⁴ segítségével modellrendszerünkön teljes szerkezetoptimalást majd frekvenciaszámolást végeztünk, ezután a kapott eredmények tükrében következtettünk képződésük okára. Hogy a valósághoz közelebbi képet nyerjünk, számításokat végeztünk oldószerbe (vízbe) helyezett β -redős modellszerkezetekre is.

Munkánk célja volt a számított termodinamikai függvények változásainak nyomon követése oligopeptidek dimerizációja során az aminosavszám függvényében, mind parallel, mind antiparallel β -redő esetén, valamint az egy egység hozzáadásakor a függvényértékekben fellépő relatív növekmények jóslása nagy rendszerekre nézve. Antiparallel esetben mindhárom említett függvény értékei lépcsősen változnak, e jelenség okára is célunk volt magyarázatot adni, mégpedig rezgési analízis segítségével. Ennek során a monomerekből eltűnő és a dimerekben megjelenő 6 új rezgési módus azonosítását kívántuk elvégezni a 10-, 14- és a 12-tagú H-kötésű pszeudogyűrűk esetében is. 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. A kutatás utóbbi két szegmense tekinthető saját, önálló munkámnak.

6. A stabilitásvizsgálat elméleti kémiai módszerei

6.1. Alkalmazott számítási eljárások

6.1.1. A megfelelő elméleti szint kiválasztása

A sűrűségfunkcionál módszerek alkalmazása napjainkban főleg bonyolultabb kémiai és biológiai rendszerek vizsgálata során került előtérbe, ahol a különböző *ab initio* hullámfüggvény módszerek túl költségesnek és a velük történő számítások nehezen kezelhetőnek bizonyultak. Sok elektronból álló rendszerek esetén nincs lehetőség az elérhető legjobb korrelációs módszer és legnagyobb bázis használatára, mert a befektetett idő a pontosságban nem térül meg. A másik érv, amely a DFT módszerek használata mellett szól a különböző poszt-Hartree-Fock módszerekkel szemben a relatíve kis számításigényen kívül az, hogy az e számításokból nyert adatok pontossága bőven elegendő a belőlük kialakítani kívánt kvalitatív kép megalkotásához, anélkül, hogy a pontosság csökkenése számottevő hibát okozna. E rendszerek tanulmányozása során általában valamilyen, a biológiai (esetleg orvosi) gyakorlatban jól felhasználható tendenciát, illetve áttekintést szeretnénk bemutatni, ehhez pedig nem szükséges a módszerből esetlegesen adódó kis eltérések figyelembe vétele. A DFT-n belül természetesen törekedni kell a lehető legpontosabb, az adott rendszer tulajdonságait és kölcsönhatásait a lehető legjobban leíró módszer használatára, ezért is érdemes a manapság egyre növekvő számban rendelkezésre álló, 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.

A biológiai szempontból fontos molekulák modellezése során a legmeghatározóbb az azokat összetartó H-kötések és a diszperziós kölcsönhatások helyes leírása. E kölcsönhatások kezelése sajnos igen bonyolultnak adódik a DFT módszerekkel¹⁵, mivel, amint azt már a 4.2 alfejezetben is 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.

A Zhao és Truhlar által kifejlesztett M05-2X funkcionál⁶, amely az ún. meta-GGA (meta-Generalized Gradient Approximation) funkcionálok egyike, kifejezetten nem kovalens kölcsönhatásokat tartalmazó rendszerek termokémiai vizsgálatához készült. A meta-GGA funkcionálok egyik jellegzetessége, hogy ahhoz, hogy pontosabb van der Waals energia értékeket

nyerjenek, a funkcionálok paramétereit rendkívül sok kísérleti termokémiai adatra történő illesztéssel határozták meg. Az illesztéshez felhasznált komplexekhez hasonló rendszerek esetén ezért igen jó egyezést mutat a módszer, ám sajnos ez sem ad fizikailag korrekt leírást a diszperzióra (továbbra sem a funkcionál korrelációs tagjából, hanem a kicserélődési tagból származik a kölcsönhatás leírása). Az M05-2X-szel nyerhető termokémiai pontosság és a fehérje aggregátumokban igen fontos szerepet játszó diszperziós kötőerők pontosabb leírása végett a gyakran használt B3LYP módszer helyett ezt a funkcionált választottuk modellrendszerünk vizsgálatához. Az irodalomban igen kedvelt B3LYP funkcionál a diszperziót egyáltalán nem becsüli, tekintve azonban, hogy az esetünkben legfontosabb H-kötési energiákat mindkét módszer elegendően pontosan reprodukálja, kiegészítő számításokat végeztünk az utóbbi segítségével is.

6.1.2. A BSSE kezelése

Több peptid szálból álló molekulák modellezése során jelentős hibát okozhat az ún. $BSSE^{16,17}$ (Basis Set Superposition Error), a közeli bázisfüggvények átfedéséből adódó hiba. Ennek hatékony kiküszöbölésére szolgálhat az ún. Counterpoise (CP) korrekció, amelyet a következőképpen számíthatunk¹⁸:

$$E_{kötési} = E_{AB}^{ab} - (E_A^a + E_B^b) \quad (32)$$

$$E_{CP} = E_{A*}^{ab} + E_{B*}^{ab} - (E_{A*}^a + E_{B*}^b) \quad (33)$$

$$E_{kötési}^{CP} = E_{kötési} - E_{CP} \quad (34)$$

ahol E_{AB}^{ab} egy **A** és **B** molekulából képződött komplex teljes energiája, E_A^a és E_B^b pedig az egyes molekulák energiája a komplexben külön-külön. Ezek az értékek BSSE hibával jelentősen terheltek, mivel a komplexen belül az **A** molekula energiájának számításához az elektronszerkezet számító program **B** bázisfüggvényeit is felhasználja, a térbeli közelség miatt. Ennek kiküszöbölésére kiszámítjuk az E_{CP} korrekciós energiát, az E_{A*}^{ab} és E_{B*}^{ab} **A** és **B** önálló molekulák mindkét molekula bázisfüggvényeinek felhasználásával számított energiaértékeiből, illetve az E_{A*}^a és E_{B*}^b tagokból, amelyek számításakor csak az adott molekulához tartozó bázisfüggvényeket vettük figyelembe, mintha a molekulák végtelen távolságban lennének egymástól. Ezek után a helyes kötési energiát az $E_{kötési}$ E_{CP} -vel történő korrigálásával kapjuk. A BSSE hiba értéke a bázis méretének növelésével jelentősen csökken, nagy bázis használata esetén 1 kcal/mol alá vihető. Azonban a biológiai rendszerek, főleg a fehérjék másodlagos szerkezeti elemeinek modellezése

során gyakran alkalmazott split-valence 6-31G(d) közepes bázis esetén a BSSE értéke összemérhető a rendszer stabilitását jellemző relatív energiakülönbségekkel, így a CP korrekció (esetleg más alternatív módszer) alkalmazása elkerülhetetlen. Példának okáért egy β -redő modell közepes double-zeta bázison CP korrekció nélkül számított stabilitása nagyobbak adódik, mint az α -hélixé, a bázisátfedési hibát korrigálva viszont (a valóságnak megfelelően) az α -hélix mutatkozik stabilisabbnak¹⁶. H-kötésű dimerek vizsgálatakor a BSSE miatt a H-kötés hossza kisebbnek adódik a valóságnál (kísérleti, vagy nagy bázison számított értékek), így a két molekula közelebb kerül egymáshoz, tehát a ténylegesnél stabilabbnak adódik a komplex.

Munkánk során a következőképpen vettük figyelembe a polialanin dimerek, illetve oligomerek bázisfüggvények átfedéséből adódó stabilitásnövekedését:

- Teljes szerkezetoptimalást és frekvenciaszámítást végeztünk az M05-2X/6-31G(d) elméleti szinten,
- ezt „*single point*” 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 BSSE-től csupán elhanyagolható mértékben terheltek (kevesebb, mint 0,5 kcal/mol)¹⁹.

6.2. Termokémiai adatok számítása és kezelése

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 (partíciós függvény) translációs, elektronikus, rotációs és vibrációs komponenseinek kiszámításával megállapítja azok hozzájárulását az S , U , és C_V értékekhez, majd ezeket

összegezve kapjuk a megfelelő, a 4.3 alfejezetben tárgyalt termodinamikai függvények (H és G) értékeit. Ezek változásából következtethetünk a modellezni kívánt aggregátumok 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 energiakorrektció, az entalpia és a szabadentalpia értékei is. A polipeptidek egyensúlyi dimerizációs (majd oligomerizációs) folyamatait tekintve az entalpiaváltozás a következő, megszokott felbontásban írható:

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S \quad (35)$$

ahol a ΔG a folyamat hajtóerejének, ΔS pedig a folyamat során a változó rendezetlenség mértékén leírására szolgáló mennyiség. Mivel a létrejövő H-kötések jellemző rezgéseinek entrópia hozzájárulása közvetlen változást idéz elő a szabadentalpia értékében, és mivel a ΔG a folyamatok hajtóerejének mérésére szolgál, joggal következtethetünk arra, hogy az új, a peptidszálak összeállásából adódó kölcsönhatások tulajdonságai szabják meg, hogy az aggregátumok képződése kedvező ($\Delta G < 0$), avagy nem ($\Delta G > 0$). N- és C-védett glicin molekulákra kimutatták²⁰, 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:

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S \quad (36)$$

Hasonlóan, az **1** állapotból a **2** állapotba haladó folyamat megnövekedett vagy lecsökkent komplexitása is az entrópiához kapcsolható:

$$\text{Komplexitás} = -T\Delta S[1 \rightarrow 2] \quad (37)$$

Egy termodinamikai rendszer teljes entrópiája két részre bontható. A konformációs (külső, angolul: extrinsic) entrópia a fehérjék lehetséges konformációs állapotainak számából becsülhető²¹, és mint ilyen, a feltekeredési folyamat jellemzéséhez nyújthat segítséget^{22,23,24}. Minthogy egy feltekeredett fehérje jól definiált szerkezettel rendelkezik, ennek az entrópiája, a belső (angolul: intrinsic) entrópia ugyancsak számítható, és az adott konformer stabilitásáról nyújt értékes információkat²⁵. Kvantumkémiai módszerekkel teljes rezgési analízist végezve már számos alkalommal sikerült a fehérjék másodlagos szerkezetének képződését és stabilitását modellezni²⁶. Egy adott konformer belső entrópiája tovább bontható translációs, forgási (együtt: mozgási, azaz angolul: motion), és rezgési tagokra:

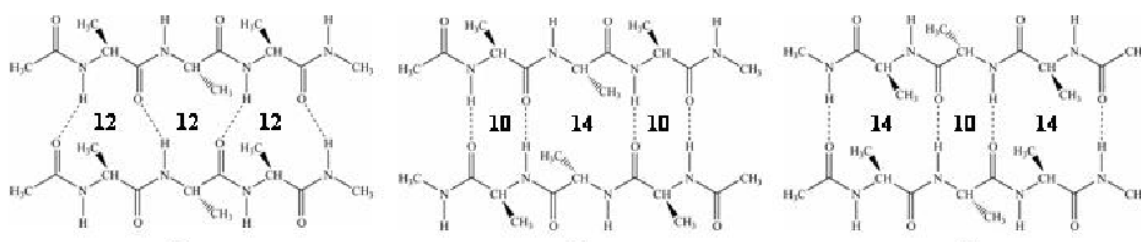
$$S_{TOT} = S_{trans} + S_{rot} + S_{vib} = S_{motion} + S_{vib} \quad (38)$$

Számításainkból kiderül, hogy dimerizáció során 3 translációs és 3 rotációs módus eltűnik (ΔS_{motion}), 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 a következő, 6.3 alfejezetben mutatunk be. Szintén egy későbbi, a 6.4 alfejezet témája lesz a termokémiai számítások kivitelezése oldószerben modellezett a rendszerek esetén.

6.3. Szerkezeti meggondolások, rezgési analízis

6.3.1. β -redős szerkezetek építőelemei

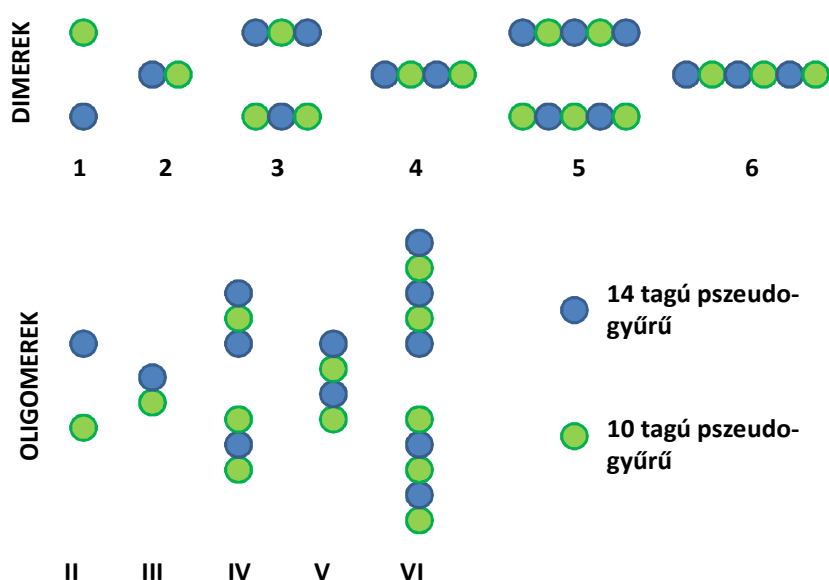
A polipeptid dimerekből egyféle parallel és kétféle antiparallel elrendeződés jöhet létre², amint azt már fentebb említettük. A parallel és az antiparallel redők különböző H-kötési mintázattal rendelkeznek: a parallel redőben minden H-kötött „pszeudo-gyűrű” 12 atomot tartalmaz, míg az antiparallel változatban a H-kötéses gyűrűket alkotó atomok száma 10 és 14 lehet.



4. ábra: Parallel (balra) és antiparallel (középen és jobbra) β -redők H-kötött gyűrűs egységei

Bármennyire is hasonló a szerkezetük, e három H-kötött „nanorendszer” viselkedése mégis különbözőnek mutatkozik. Miután a glicin és alanin diamidok dimerizációjának termodinamikai jellemzését már elvégezték¹⁰, oligoalanin szálak és β -redős szerkezetek tanulmányozását tűztük ki célul, minthogy ezek az előbbieknél megfelelőbb modellt szolgáltatnak az amiloid peptidek vizsgálatához. Annak érdekében, hogy a kívánt termodinamikai függvények változását nyomon követhessük egy oligoalaninokból álló β -redő képződése során, teljes szerkezetoptimalást és frekvenciaszámítást végeztünk mind oligoalanin mono- ($\text{HCO}-(\text{Ala})_n\text{-NH}_2$, $n=1-6$) és dimerek,

illetve mono- és dialanin oligomerek (hexamerig) esetében is, az M05-2X/6-31G(d) elméleti szinten. 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. ábra: Oligoalanin dimerek és monoalanin oligomerek vázlatos szerkezete. Az arab számok (1-6) az alanin egységek számát, a római számok (II-IV) pedig az összekapcsolódó "szálak" számát jelölik.

6.3.2. β -redő elemeinek rezgési analízise során alkalmazott módszerek

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^{27,28} 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. Jelen 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 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 03 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 %-nál, illetve 200 cm⁻¹-nél. Ha a dimer rezgésre nem található az előbbieknél 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 utána 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+ programban²⁹ 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 kisebb, mint a második legnagyobb arányban jelen levő módusé, tehát ha nem tudunk egy domináns monomer rezgést azonosítani a lineáris kombinációban.

6.4. Modellezés oldószerben

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. Ma már számos, kvantumkémiai programcsomagba beépített oldószer-modellező program létezik, számításaink során mi a Gaussian 03 IEFPCM (Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model) modelljét alkalmaztuk, amelyet Tomasi és munkatársai³⁰ fejlesztették ki.

Az oldószer modellezésénél leggyakrabban egy olyan folytonos (kontinuum) közeget imitálnak, amelynek dielektromos tulajdonságai megegyeznek a kiválasztott oldószerével, az oldószermolekulákat nem explicit módon kezelik. Ezt úgy valósítják meg (az IEFPCM keretein belül), hogy ennek a közegnek a belsejében definiálnak egy térrészt, ún. *cavity*-t (üreget), és ebbe „helyezik” az oldott molekulát³¹. A belső térrész határvonalait a molekula atomjain/atomcsoportjain levő átfedő gömbök, vagy pedig egy kiválasztott állandó töltéssűrűségű „izofelszín” segítségével alakítják ki. Az oldódási folyamatot általában három különálló részre bontva kezelik, ezek a következők: az említett térrész kialakítása, a diszperziós és taszítási, majd az elektrosztatikus kölcsönhatások figyelembe vétele. Általában, főleg poláris vagy ionos molekulák esetén az utóbbiak határozzák meg az oldószerhatást. Az oldószer polarizációs hatását az oldott molekulát tartalmazó térrész felszínén a töltéssűrűség változásának segítségével írják le, ez van hatással a molekula elektronszerkezetére³². A PCM modellen belül az üreg kialakításához használt gömböket definiálhatjuk az egyes atomcsoportokhoz tartozóan (UAO modell (United Atom Orbitals): egyesített atompályák), illetve kezelhetjük külön a H-atomokat, a H-kötések pontosabb leírása céljából (UFF modell (Universal Force Fields): általános erőterek). Tekintve, hogy a rendszereinket összetartó kölcsönhatásokban a H-kötések dominálnak, az UFF eljárást alkalmaztuk számításaink során.

Feltételeztük, hogy az oldószerhatás nincs számottevő hatással a vákuumban nyert molekulaserkezetre, így oldószerben 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 „single point” energiaszámolás követte vízben a vákuumban kapott optimált térszerkezeten, IEFPCM oldószer modellt alkalmazva, az M05-2X/6-311G++(d,p)//M05-2X/6-31G(d) elméleti szinten.

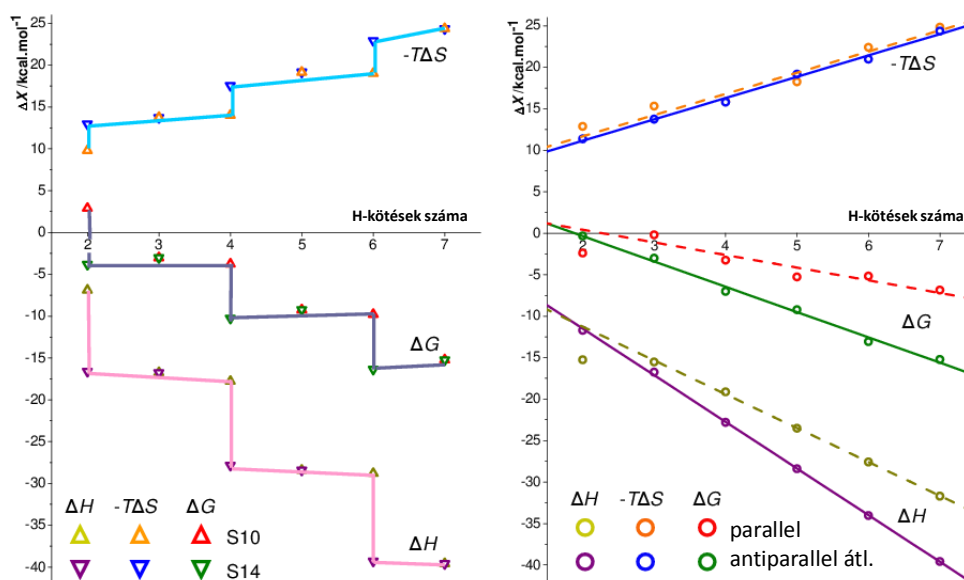
Eredményeink bemutatására a 7.3 alfejezetben kerül sor.

7. Eredmények és következtetések

7.1. Oligopeptidek dimerizációja

7.1.1. Termodinamikai függvények változása a dimerizáció során

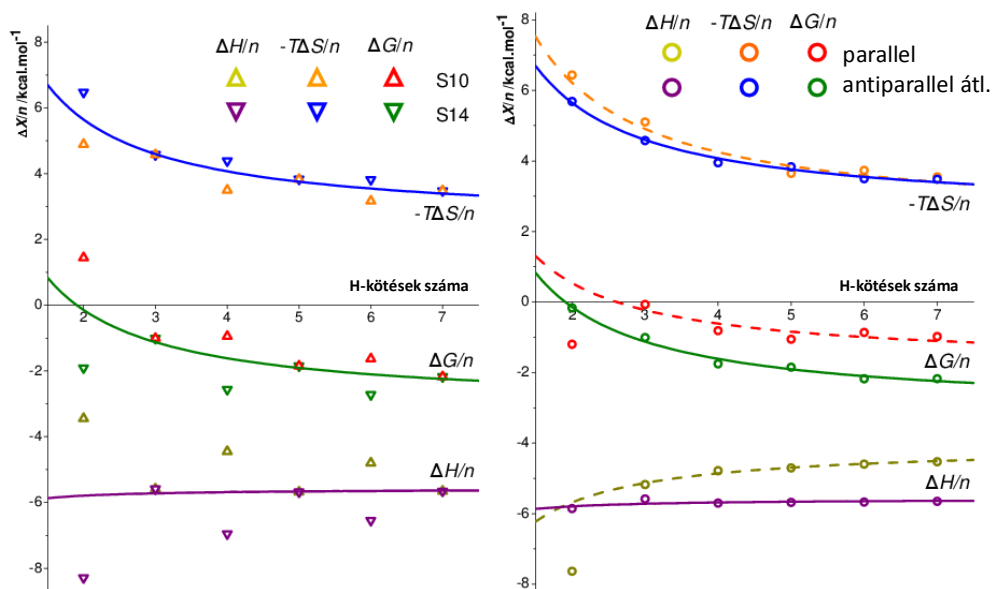
A $\Delta X = -T\Delta S$, ΔH és ΔG termodinamikai függvények értékeinek változása az 1-6 egységet tartalmazó oligopeptid szálak dimerizációja során, mind antiparallel, mind parallel β -redő képződése esetén a következő ábrán látható (számított adatokat ld. a Függelék 7-10. táblázatában):



6. 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 (az illesztések paramétereit ld. a Függelék 1. táblázatában). 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. 7. 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 (ld. Függelék 1. táblázata).



7. 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 mutat², 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 (7. 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 7. 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 lánchossz növekedésével (6. 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. Az egyes normált függvényekre történő illesztések paraméterei szintén a Függelék 1. táblázatában találhatók.

Megfigyelhető, hogy a (30) egyenletbeli entrópiatag ($-T\Delta S$) hidrogénkötések számától való függése jelentősebb, mint az entalpiatag (ΔH). Ez alapján arra következtethetünk, hogy a β -redő képződése (az első, dimerizációs lépést tekintve) kis aminosavszámnál entrópiásan kevésbé kedvezményezett, de az 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, amely szintén az általunk vizsgálthoz hasonló folyamatban megy végbe.

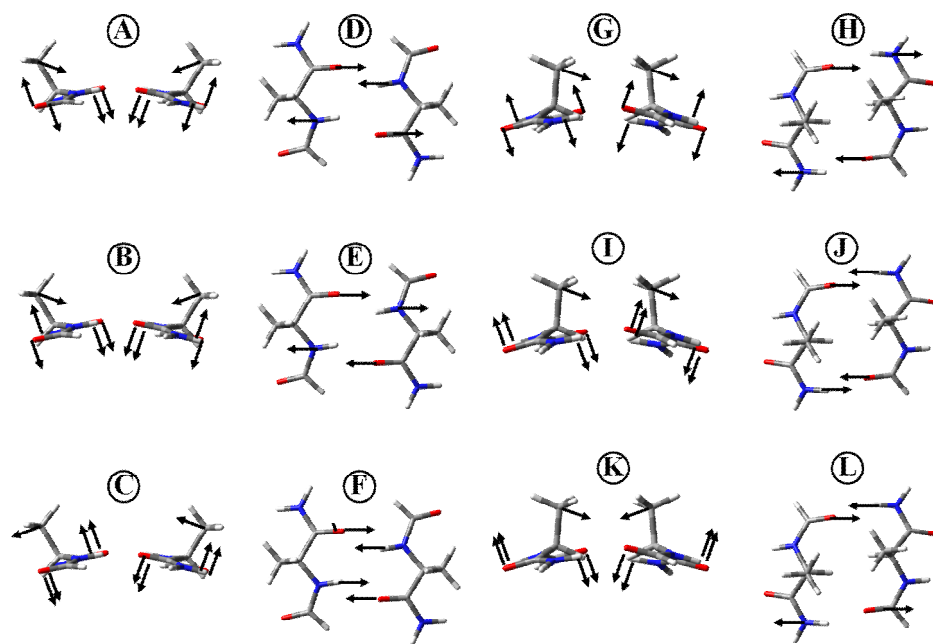
Parallel β -redők vákuumban történő modellezése során a szálak utolsó aminosav egységei γ -kanyar konformációt vesznek fel, vagyis egyazon aminosav amid- és karbonilcsoportjának H- és O-atomjai között jön létre H-kötés (természetesen emellett a redőalkotó H-híd kötés is kialakul; számadatokat ld. Függelék 9-10. táblázatában). 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.

7.1.2. *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. Perczel és munkatársai² azt feltételezték, hogy az oxigén atomok közötti távolság csökkenése okozza a 14 tagú pszeudogyűrűkhöz képest a 10 tagúak képződése során fellépő kisebb entalpianyereséget. Az újonnan megjelenő 6 rezgési módusnak (ld. lentebb: 8. 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.

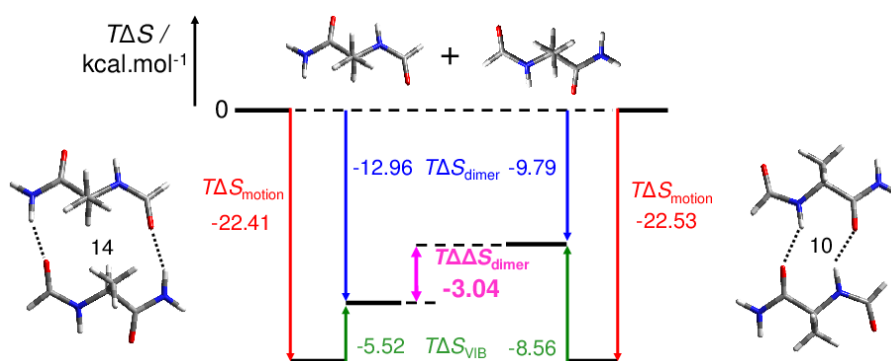


8. ábra: A-F: a dimerizációs során megjelenő 6 "új" dimerrezgés sematikus ábrázolása a 10 tagú pszeudogyűrűs rendszerekben. G-L: a 14 tagú gyűrűk 6 új dimerrezgésének vázlata.

Számításaink a vártaknak megfelelően a TS_{motion} 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 (ld. a Függelék 3. táblázatát). Mindez a TS_{motion} tag

molekulasúlytól való függésével magyarázható, amely a parallel és az antiparallel β -redőre nézve ugyanaz, tekintve, hogy azonos számú és minőségű atomokból állnak.

A dimerek képződése a hat új dimerrengés 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 járulékat 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_{motion} , hanem a monomerek rezgési módusainak entrópiavonzata, a $TS_{monomer}$ tag értéke is csökken. Így tehát csak a hat új dimerrengéshez kapcsolódó $T\Delta S_{dimer}$ rezgési entrópiátagnak kompenzálja a dimerizáció során fellépő entrópia veszteséget.



9. 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, 9. ábrán látható a 10-es és 14-es gyűrűs rendszerek rezgési entrópia hozzájárulásának nettó különbsége, amely pontosan akkora, mint a 7. ábrán kapott lépcső „lépcsőfokmagassága”, aminek következményeképpen elmondható, hogy a kétféle antiparallel redőbeli szerkezeti elem eltérő stabilitásának fő okozója a fenti entrópia-különbség.

A fent részletezett, újonnan kidolgozott módszerek segítségével csupán a kevésbé összetett, egy-egy 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 lehetetlennek bizonyult. Ennek ellenére ezeknek az alanindimereknek a vizsgálatából is világosan 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. Ezen felüli további elemzés, mint említettük, a rendszerek növekvő komplexitása miatt e módszerekkel már nem lehetséges.

7.1.2. Normált termodinamikai függvényértékek a dimerizáció általános jellemzésére

Az alábbi táblázat alapján nem tűnik olyan nagynak a dimerizációs folyamatot jellemző termodinamikai függvények értékeiben beálló változás nagysága, mégis ez vezet először β -redők, majd pedig a szervezetben megtalálható amiloid szerkezetű plakkok keletkezéséhez.

	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 képződését leíró normált termodinamikai paraméterek összevetése az M05-2X/6-31G(d) elméleti szinten nyert adatok alapján.

Amint a fenti adatokból is jól látszik ($\Delta \Delta G = -1,32 \text{ kcal/mol}$), az első, dimerizációs lépést tekintve hosszabb polipeptidekre a kétféle szerkezet közül az antiparallel változat képződése a kedvezményezett ($\Delta G = -3,08 \text{ kcal/mol}$ antiparallel, és $\Delta G = -1,76 \text{ kcal/mol}$ parallel redő esetén).

Habár az amiloid-szerkezetű plakkokon (pl. A β 1-42)³³ 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 $7,56 \text{ kcal/molK}$ értékű H-kötésenkénti entrópia növekedés 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 visszafordítására a jövőben nem reménytelen feladat.

7.2. Peptidszálak oligomerizációjának vizsgálata

7.2.1. Monoalanin oligomerek parallel és antiparallel szerkezeteinek összehasonlítása

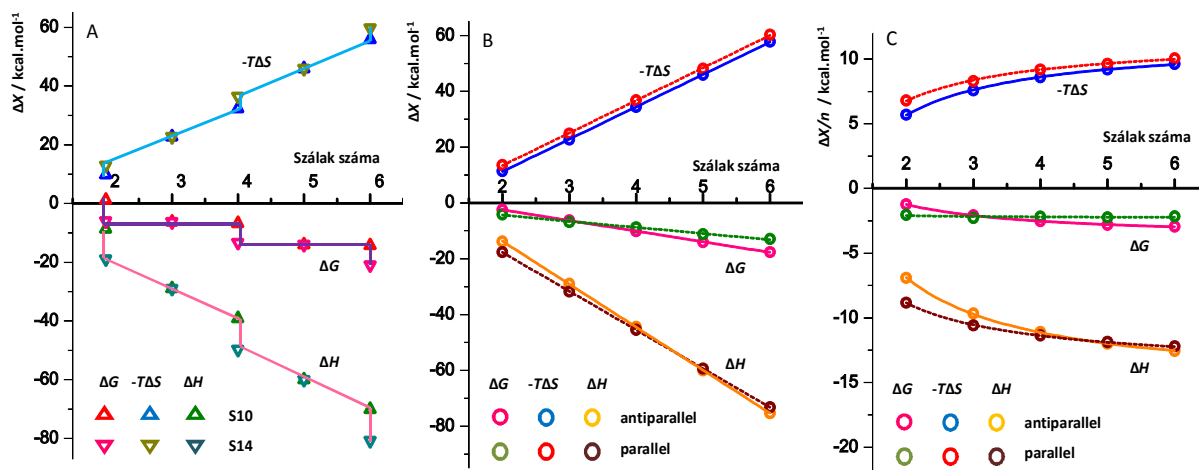
Az eddig bemutatott vizsgálatokból kiderült, hogy oligopeptidek dimerizációja során a β -redős szerkezet képződése minden esetben kedvező, és a folyamatot jellemző termodinamikai függvények megváltozásának normált értékeit felhasználva a redők stabilitása jósolható is

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 a 6.1 alfejezetben leírtak szerint. Ebben az esetben monoalanin és dialanin egységekből képződő, 2-6 „szálból” álló oligomereket alkalmaztunk 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 10/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.

Amint azt az 5. ábrán már vázoltuk, 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 két módszer egyikével sincs lehetőségünk rezgési analízist végezni a komplexek mérete és a bonyolult módon csatolódo rezgési módusok miatt. Összevetve az antiparallel redő esetén kapott értékek átlagait (amelyek a vártaknak megfelelően egy egyenesre esnek: $R^2=0,999$) a parallel eset függvényértékeivel (10/B ábra), azt tapasztaltuk, hogy bizonyos szálszám felett (ez lehet 4, 5 illetve 6) 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 jóslását nagyobb rendszereket illetően, ahogy ezt a dimerek képződésének tanulmányozásánál is láthattuk. Amint az a 10/C ábrán látható, az említett függvényérték-változások szálak száma szerinti normálásával az oligomerizációs folyamatra is jellemzően egy-egy konstans értékhez tartó, hiperbolikus görbét kaptunk. Az illesztés paramétereit a Függelék 4. táblázatában foglaltuk össze. Megfigyelhető, hogy a 2. szál 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 „szál” esetén azonban a parallel változat a stabilabb. Így tehát, mivel a ΔG érték antiparallel esetben nagyobb mértékben csökken, a kialakuló redő stabilabbnak adódik. (Az illesztések paramétereit ld. a Függelék 4. táblázatában.)

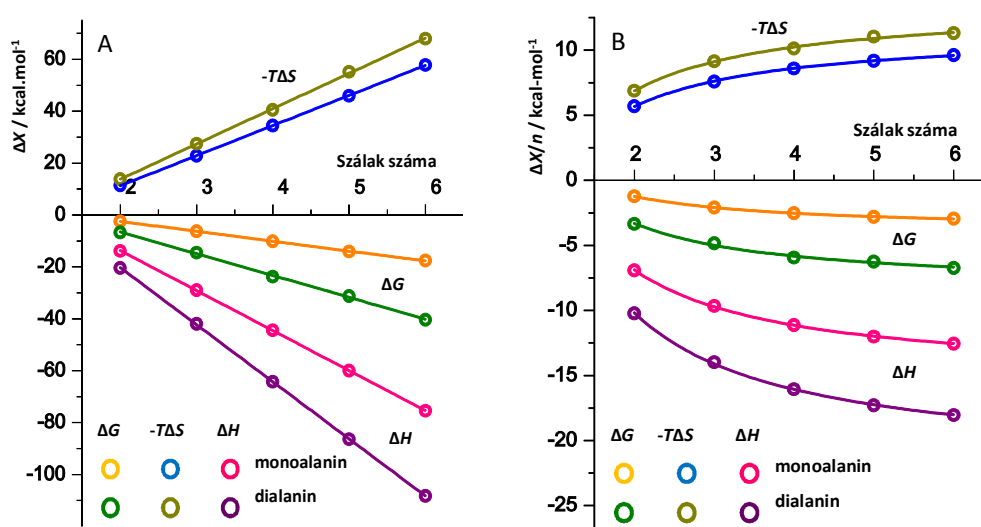


10. ábra: A: $-T\Delta S$, ΔH és ΔG vs. szálak száma monoalanin antiparallel β -redőben. B: $-T\Delta S$, ΔH és ΔG vs. szálak száma parallel oligomerek (szaggatott vonal, 12 tagú gyűrűk), illetve a kétféle antiparallel oligomerhez tartozó átlagértékek (folytonos vonal, 10- és 14 tagú gyűrűk) esetén monoalaninra.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

7.2.2. 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 szálaból álló oligomerekre is elvégeztük az fenti számolásokat, azonos elméleti szinten. Ebben az esetben a keletkező antiparallel redők tulajdonságait hasonlítottuk össze mono- és dialanin szálakra 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 szálak számának függvényében (11/A ábra). A dialanin szálak 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 szálakat tekintve egyenesen arányos függést kapunk ($R^2=0,999$ mindkét esetben) azok számától. A 11/A ábrán látható függvények értékeit normáltuk a szálak száma szerint (ld. 11/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. Ezen illesztések paramétereit a Függelék 5. táblázatában mutatjuk be. 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 (ld. Függelék 5. táblázat), valamint az ebből adódó jelentősen alacsonyabb ΔG^∞ értékből arra következtethetünk, hogy a dialanin szálak aggregációja a monoalanin egységénél is kedvezőbb, stabilabb redős szerkezetet eredményez.



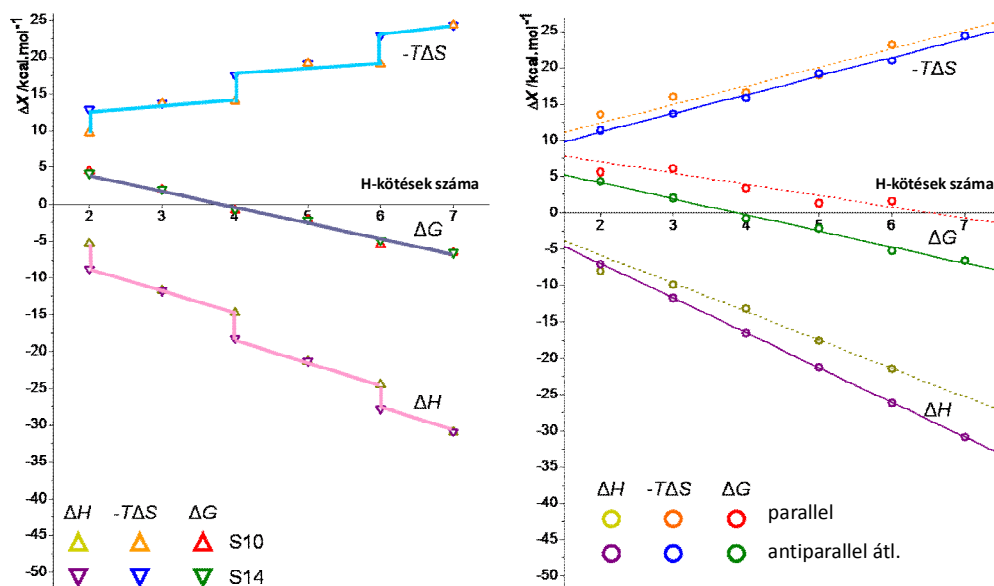
11. ábra: A: $-T\Delta S$, ΔH és ΔG vs. szálak száma antiparallel β -redőben mono- (átlagértékek) és dialanin esetben. B: $-T\Delta S/n$, $\Delta H/n$ és $\Delta G/n$ vs. szálak száma (itt n) antiparallel redőben mono- és dialanin egységek esetén.

A fenti eredmények tükrében elmondhatjuk, hogy a β -redős szerkezetet pontosabban közelítő dialanin oligomerek stabilitása jelentős, és ez valószínűleg 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.

7.3. β -redős szerkezetek stabilitása oldószerben

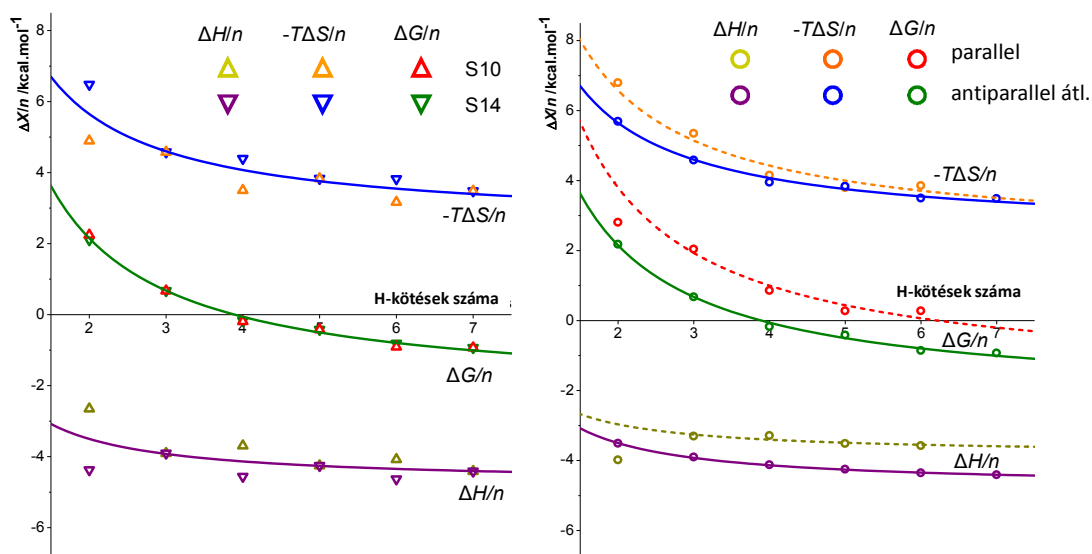
A vákuumban kapott számítási eredményeink megerősítése érdekében, a 6.4 alfejezetben leírtak szerint oldószeres, jelen esetben vizes közegben „single point” energiaszámítást végeztünk minden modellszerkezetre a M05-2X/6-311G++(d,p)// M05-2X/6-31G(d) elméleti szinten, az IEFPCM oldószermodellt alkalmazva. 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 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 eredményeként 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. (Illesztési paraméterek a Függelék 6. táblázatában.)



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 antiparallel dimerhez tartozó átlagérték (folytonos vonal) esetén vízben.

7.4. Stabilitás jóslása, konformációs entrópia

7.4.1. β -redős szerkezetek stabilitásának jóslása

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. Részben ezzel magyarázható, hogy bár termodinamikai megközelítésünk eredményeként egyértelműen az antiparallel β -redős szerkezet adódik stabilabbnak, a kísérleti kutatócsoportok mégis parallel redők képződéséről számolnak be Alzheimer-kórban szenvedő

betegtektől származó minták elemzése során. Ám a fent ismertetett eredmények (normált ΔG értékek) azt is mutatják, hogy rövidebb peptidek, és kevés szál összeállása esetén még a parallel β -redő képződése kedvezményezett. Így valószínűsíthetjük, hogy mivel a plakkok kialakulása kisebb peptidrészletek összekapcsolódásával indul, kezdetben a parallel szerkezet alakul ki, és a további aggregációs lépések során ez is növekszik tovább.

Ahogy már a dimerizáció tanulmányozásakor is megjegyeztük, abból, hogy vizsgálataink a parallel redőt kevésbé mutatják stabilisnak, arra következtethetünk, hogy destabilizálásához kis zavaró hatás is elegendő. Tehát amennyiben sikerül megtalálni a módját ilyen zavaró hatás keltésének, a plakkok képződés nagy eséllyel megállítható, illetve visszafordítható lesz.

7.4.2. *A konformációs entrópia szerepe a β -redős szerkezetek stabilitásában*

A fenti eredmények mindegyik azt mutatja, hogy a β -redős szerkezetek keletkezése kedvező folyamat, a redők stabilitása igen nagy. 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, ld. 6.2 alfejezetben), viszont a konformációs entrópiát csupán a Boltzmann féle valószínűségi megközelítést (ld. (31) egyenlet) felhasználva becsülhetjük (ld. alábbi példa).

Az általunk számított termodinamikai függvények megváltozása a

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (39)$$

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

$$\Delta \Gamma = \Delta H - T\Delta(S + \Sigma) \quad (40)$$

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

$$\Delta \Gamma = \Delta G - T\Delta \Sigma \quad (41)$$

Tekintsük példaként egy antiparallel oktaalanin-oktamer (8 darab 8 aminosavat tartalmazó szálból álló) β -redős szerkezet esetét. A fenti eredmények alapján kapott relatív szabadentalpia

nyereség 8 aminosavból álló peptidszál esetén: $9 \times 3,08 + 6 \times 7 \times 3,83 = 188,58$ kcal/mol. (ld. a Függelék 1. és 4. táblázatbeli értékeit). 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 ΔF 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 érthető, 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 lenne – a megfelelő módszer megtalálásával.

8. Összefoglalás

A dolgozatban elsőként röviden áttekintettük a későbbiekben, a munka részletes ismertetése során felmerülő határterületeket, azok alapfogalmait, illetve vázoltuk az alkalmazott módszerek elméleti hátterét. Majd, a célkitűzéseknek megfelelően, az Alzheimer-kór kialakulását okozó amiloid szerkezetű plakkok képződésének, és a létrejött szerkezet stabilitásának termokémiai vizsgálatát mutattuk be különböző peptid modellrendszereken.

Kvantumkémiai számításokat végeztünk 1-6 aminosav-egységet tartalmazó oligoalaninok dimerizációját 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 ellenőrzésekként, és mert a dialanin-oligomerek az előzőeknél jobban közelítik a β -redős szerkezetet, e rendszerekre is elvégeztük számításainkat. Ez utóbbi két feladat elvégzése tekinthető saját munkámnak. Hogy a valósághoz közelebbi képet nyerjünk, vizes közegben is vizsgáltuk a redős szerkezetek kialakulását kísérő változásokat.

A kvantumkémiai úton 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 részletes rezgési analízis segítségével magyaráztuk. Annak érdekében, hogy nagyobb rendszerek esetére jósolhatóvá tegyük az egyes termodinamikai függvények megváltozását, ezeket a hozzáadott egységek (H-kötés, vagy szál) száma szerint normáltuk. Ekkor minden esetben konstans értékekhez tartó görbéket nyertünk, amelyek azt mutatják, hogy kiterjedtebb redők esetén csupán kis, állandó értékkel változik meg egy elem hozzáadására azok stabilitása.

Összevetve a parallel és antiparallel β -redős szerkezetek stabilitását, mind vákuumban, mind pedig oldószerben (víz) az antiparallel redők mutatkoztak stabilabbnak, a legkedvezőbb modellszerkezetek pedig a dialanin-oligomerek voltak. Ám a parallel redők kisebb stabilitása arra enged következtetni (mivel e rendszerek fordulnak elő az Alzheimer-kórt okozó plakkokban), hogy akár egy kisebb perturbáló hatás is megállíthatná az aggregációjukat, vagy előidézhetné a plakkok disszociációját. Ilyen hatású gyógyszer megtalálása nagyban elősegíthetné a betegség gyógyítását.

9. 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 okításomra áldozott, és azt, hogy soha egyetlen szakmai kérdésem sem maradt megválaszolatlanul. Köszönet illeti Dr. Jáklí Imrét az informatikai jellegű problémák elsimításáért és a realitások észben tartásáért, továbbá a Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium minden tagját a jó hangulatért és a magas koffeintartalmú beszélgetésekért. Köszönöm Dr. Csizmadia G. Imre tanár úrnak a dolgozat alapjául szolgáló cikk lektorálását és értékes szakmai tanácsait. Ezen kívül szeretném megköszönni barátaimnak, hogy lelkesedésem minden mellékhatását elviselték és segítségemre voltak csekély szabadidőm eltöltésében. Végül, de nem utolsó sorban a legmélyebb köszönet Szüleimet illeti a szeretetért és támogatásért, amit az elmúlt 22 évben Tőlük kaptam.

10. Irodalomjegyzék

¹ Dobson, C. M., *Nature*, **2005**, 435, 747

² Perczel, A.; Hudáky, P.; Pálffy, V. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 14959

³ Veszprémi Tamás, Fehér Miklós; A kvantumkémia alapjai és alkalmazása, 94-101.o., 104-126.o., 161-229.o., *Műszaki Könyvkiadó*, **2002**

⁴ Gaussian 03, Revision C.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.

⁵ Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., *Physical Review B* (2) 37, **1988**, 785.

⁶ Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, 2, 364

⁷ Keszei Ernő; Bevezetés a kémiai termodinamikába, 9-63. o., egyetemi jegyzet, **2007**

⁸ Kajtár Márton; Változatok négy elemre, 819-887.o., ELTE Eötvös Kiadó, faksimile kiadás, **2009**

⁹ http://szerves.chem.elte.hu/oktatas/ea/biologiaikemia_feherjek.pdf (utolsó elérés: 2011.05.15.)

¹⁰ Perczel, A.; Ángyan, J. G.; Kajtár, M.; Viviani, W.; Rivail, J. L.; Marcoccia, J. F.; Csizmadia, I. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113: 6256-6265

¹¹ Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A. O.; Riekel, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D., *Nature*, **2005**, 435, 773

¹² 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.

-
- ¹³ Chiti, F.; Dobson, C. M. *Nature Chemical Biology*, **2009**, 5, 15
- ¹⁴ Pohl, G.; Jákli, I.; Csizmadia, I. G.; Papp, D.; Matias, G. F.; Perczel, A.; *J. Comp. Chem.*, *beküldés alatt*
- ¹⁵ Johnson, E. R.; Mackie, I. D.; DiLabio, G. A.; *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, 22 1127–1135
- ¹⁶ Balabin, R. M.; *J. Chem. Phys.*, **2010**, 132, 231101
- ¹⁷ Simon, S.; Bertran, J.; Sodupe, M.; *J. Phys. Chem.*, **2001**, 105, 4359-4364
- ¹⁸ http://organ.elte.hu/farkas/Teach/TOC11/e_01_02.pdf (utolsó elérés: 2011. 05. 15.)
- ¹⁹ Beke, T.; Csizmadia, I. G.; Perczel, A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 5158
- ²⁰ Fejer, S. N.; Csizmadia, I.G.; Viskolcz, B.; *J. Phys. Chem.*, **2006**, A110, 13325
- ²¹ Street, A. G.; Mayo, S. L., *PNAS*, **1999**, 96, 9074
- ²² Thompson, J. B.; Hansma, H. G.; Hansma, P. K.; Plaxco, K. W., *J. Mol. Biol.*, **2002**, 322, 645
- ²³ Baumketner, A.; Shea, J-E., *Biophysical Journal*, **2005**, 89, 1493
- ²⁴ Xu, W.; Ping, J.; Li, W.; Mu, J., *J. Chem. Phys.*, **2009**, 130, 164709
- ²⁵ Viskolcz, B., Fejer, S. N.; Jensen, S. N. K.; Perczel, A.; Csizmadia, I.G., *Chem. Phys. Lett.*, **2007**, 450, 123.
- ²⁶ Viskolcz, B., Csizmadia, I. G., Jensen, S. K., Perczel, A., *Chem.Phys.Lett.*, *bírálat alatt*
- ²⁷ Kearley, S.K., *J. Comput. Chem.*, **1990**, 11, 1187
- ²⁸ David J. Heisterberg, **1990**, *nem publikált eredmények*, <http://www.ccl.net/ccl/software/SOURCES/C/quaternion-mol-fit/index.shtml>
- ²⁹ Jákli, I.; Perczel, A., *J. Pept. Sci.*, **2009**, 15, 738
- ³⁰ Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R.; *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2999-3093
- ³¹ http://www.gaussian.com/g_tech/g_ur/k_scrf.htm (utolsó elérés: 2011. 05. 15.)
- ³² anuf.anu.edu.au/~ivr900/files/Continuum_Solvation_Models_in_Gaussian_03.pptx (utolsó elérés: 2011. 05. 15.)
- ³³ , T.; Ritter, C.; Adrian, M.; Riek-Loher, D.; Bohrmann, B.; Doeli, H.; Schubert, D.; Riek R, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, 102, 17342.

11. Függelék

1. táblázat: A nyers és a normált termodinamikai függvények (Y) értékei közötti kapcsolat vizsgálatának illesztési paraméterei a láncközi H-kötése számának függvényében, For-(Ala)_n-NH₂ n=1-6 dimerizációja esetén, vákuumban.

(Y) parallel esetben	Y = mn+b		R ²	(Y/n) parallel esetben	Y/n = M+B/n		R ²
	m	b			M	B	
-TΔS	2.56	6.56	0.896	-TΔS/n	2.28	7.87	0.876
ΔH	-4.08	-3.08	0.999	ΔH/n	-4.04	-3.28	0.968
ΔG	-1.52	3.47	0.794	ΔG/n	-1.76	4.59	0.770
(Y) antiparallel esetben	Y = mn+b		R ²	(Y/n) antiparallel esetben	Y/n = M+B/n		R ²
	m	b			M	B	
-TΔS	2.57	5.99	0.987	-TΔS/n	2.50	6.30	0.990
ΔH	-5.62	-0.24	0.999	ΔH/n	-5.58	-0.43	0.414
ΔG	-3.05	5.4	0.989	ΔG/n	-3.08	5.86	0.984

2. táblázat: Az antiparallel (For-Ala-NH₂)₂ 10 legalacsonyabb frekvenciájú rezgési módusának vizsgálata.

Rezgés	S14				S10			
	ν / cm ⁻¹	S / cal.mol ⁻¹ K ⁻¹	Módszer ^a		ν' / cm ⁻¹	S / cal.mol ⁻¹ K ⁻¹	Módszer ^b	
			JustFit	LinComb			JustFit	LinComb
1	37.4	5.392	G	G	13.2	7.467	A	A
2	38.9	5.313	H	H	24.0	6.27	B	B
3	50.9	4.782	I	I	38.1	5.353	C	C
4	79.6	3.901	M1	M1	50.5	4.796	M1	M1
5	86.7	3.734	J	J	59.6	4.469	D	D
6	90.8	3.642	M2	M2	67.6	4.223	E	E
7	95.4	3.547	M1	M1	74.2	4.039	M2	M2
8	102.1	3.414	M2	M2	81.9	3.844	M1	M1
9	129.3	2.956	K	K	84.9	3.774	M2	M2
10	135.4	2.868	L	L	114.52	3.191	F	F

ν a rezgések hullámszámát, S az egyes rezgési módusokhoz tartozó entrópiájárulékot jelöli.

^aA,B,C,D,E és F a 8. ábrán bemutatott parallel dimer rezgési módusokat jelöli, G,H,I,J,K és L pedig az ugyanezen az ábrán bemutatott antiparallel rezgési módusokhoz tartozó jel. M1 és M2 a szimmetrikus és az antiszimmetrikus csatolásokat jelöli, az első (M1) és a második (M2) legalacsonyabb monomer rezgési módusok esetén.

3. táblázat: A teljes, mozgási és vibrációs entrópia tagok (TS_{TOT} , TS_{motion} , TS_{VIB}) és változásuk ($TΔS_{TOT}$, $TΔS_{motion}$, $TΔS_{VIB}$) a (For-Ala-NH₂)₂ két lehetséges antiparallel szerkezetének kialakulása esetén, az M05-2X/6-31G(d) elméleti szinten számítva^a.

	TS_{TOT} / kcal/mol	$TΔS_{TOT}$ / kcal/mol	$TS_{mozgási}$ / kcal/mol	$TΔS_{motion}$ / kcal/mol	TS_{VIB} / kcal/mol	$TΔS_{VIB}$ / kcal/mol	$TΔS_{dimer}$ / kcal/mol	$TΔS_{monomer}$ / kcal/mol
mono (2x)	54.87	0	40.89	0	13.98	0	0	0
S14	41.91	-12.96	22.41	-18.48	19.50	5.52	7.47	-1.95
S10	45.08	-9.79	22.53	-18.36	22.54	8.56	10.29	-1.72

^a Standard hőmérsékleten és nyomáson (T=298.15K, p=1 atm)

4. táblázat: A nyers és a normált termodinamikai függvények (Y) értékei közötti kapcsolat vizsgálatának illesztési paraméterei a szálak számának (itt n) függvényében, monoalanin egységek oligomerizáció esetén, vákuumban.

(Y) parallel esetben	$Y = mn+b$		R^2	(Y/n) parallel esetben	$Y/n = M+B/n$		R^2
	m	b			M	B	
$-T\Delta S$	11.67	-9.95	0.999	$-T\Delta S/n$	11.60	-9.70	0.997
ΔH	-13.88	10.02	0.999	$\Delta H/n$	-13.90	10.09	0.999
ΔG	-2.21	0.06	0.992	$\Delta G/n$	-2.30	0.38	0.059
(Y) antiparallel esetben	$Y = mn+b$		R^2	(Y/n) antiparallel esetben	$Y/n = M+B/n$		R^2
	m	b			M	B	
$-T\Delta S$	11.61	-11.98	0.999	$-T\Delta S/n$	11.55	-11.79	0.999
ΔH	-15.42	17.14	0.999	$\Delta H/n$	-15.38	17.00	0.999
ΔG	-3.82	5.16	0.999	$\Delta G/n$	-3.83	5.21	0.999

5. táblázat: A nyers és a normált termodinamikai függvények (Y) értékei közötti kapcsolat vizsgálatának illesztési paraméterei a szálak számának (itt n) függvényében, antiparallel mono- és dialanin egységek esetén, vákuumban.

(Y) monoalanin esetén	$Y = mn+b$		R^2	(Y/n) monoalanin esetén	$Y/n = M+B/n$		R^2
	m	b			M	B	
$-T\Delta S$	11.61	-11.98	0.999	$-T\Delta S/n$	11.55	-11.79	0.999
ΔH	-15.42	17.14	0.999	$\Delta H/n$	-15.38	17.00	0.999
ΔG	-3.82	5.16	0.999	$\Delta G/n$	-3.83	5.21	0.999
(Y) dialanine esetén	$Y = mn+b$		R^2	(Y/n) dialanin esetén	$Y/n = M+B/n$		R^2
	m	b			M	B	
$-T\Delta S$	13.61	-13.47	0.999	$-T\Delta S/n$	13.61	-13.47	0.997
ΔH	-22.01	23.76	0.999	$\Delta H/n$	-21.95	23.54	0.999
ΔG	-8.40	10.29	0.999	$\Delta G/n$	-8.34	10.07	0.991

6. táblázat: A nyers és a normált termodinamikai függvények (Y) értékei közötti kapcsolat vizsgálatának illesztési paraméterei a láncközi H-kötése számának függvényében, For-(Ala)_n-NH₂ n=1-6 dimerizációja esetén, oldószerben (víz).

(Y) parallel esetben	$Y = mn+b$		R^2	(Y/n) parallel esetben	$Y/n = M+B/n$		R^2
	m	b			M	B	
$-T\Delta S$	2.56	6.56	0.896	$-T\Delta S/n$	2.28	7.87	0.876
ΔH	-3.91	2.06	0.997	$\Delta H/n$	-3.84	1.75	0.744
ΔG	-1.55	10.1	0.838	$\Delta G/n$	-1.80	11.2	0.951
(Y) antiparallel esetben	$Y = mn+b$		R^2	(Y/n) antiparallel esetben	$Y/n = M+B/n$		R^2
	m	b			M	B	
$-T\Delta S$	2.57	5.99	0.987	$-T\Delta S/n$	2.50	6.30	0.990
ΔH	-4.78	2.59	0.999	$\Delta H/n$	-4.77	2.53	0.999
ΔG	-2.21	8.58	0.991	$\Delta G/n$	-2.56	8.83	0.996

Összehasonlítva a gyakran használt B3LYP és az M05-2X DFT funkcionálokkal nyert szerkezeteket, nem találunk számottevő eltérést. Az egyetlen jelentősebb különbség a parallel (For-Ala-NH₂)₂ dimer B3LYP optimált szerkezete esetén adódik, ahol a B3LYP által jóslott alacsonyabb kölcsönhatási energia miatt γ-kanyar szerkezet alakul ki. Mivel az M05-2X funkcionál főként a diszperziós kölcsönhatási energiák pontosabb becslésére szolgál, ezeket nagyobbak, az ilyen kölcsönhatások által összetartott szerkezeteket pedig stabilabbnak mutatja, mint a B3LYP módszer. Amint azt a counterpoise-korrigált (CP) értékek mutatják, a BSSE értéke 3-4 kcal/mol /aminosav-egység körül alakul, emiatt e korrekció alkalmazása szükséges volt a különböző hosszúságú peptidszálakból képződő dimerek vizsgálata esetén.

A több szálát tartalmazó redős szerkezetek esetén a következő két elméleti szinten végeztünk számításokat: M05-2X/6-31G(d) és M05-2X/6-311++G(d,p). A „triple zeta” bázis esetén nyert értékek alacsonyabb stabilitást jósolnak e szerkezeteket illetően, összhangban azzal, hogy ilyen méretű bázis esetén a BSSE hiba már nem számottevő.

7. táblázat: Antiparallel [For-(Ala)_n-NH₂]₂ (n=1-6) β-redős szerkezetek termodinamikai függvényei különböző elméleti szinteken számítva.

Típus ^a	H-kötések	B3LYP/6-31G(d)			M05-2X/6-31G(d)			M05-2X/6-31G(d) CP		
		<i>H/</i> kcal.mol ⁻¹	<i>G/</i> kcal.mol ⁻¹	<i>S/</i> Cal.mol ⁻¹ K ⁻¹	<i>H/</i> kcal.mol ⁻¹	<i>G/</i> kcal.mol ⁻¹	<i>S/</i> Cal.mol ⁻¹ K ⁻¹	<i>H/</i> kcal.mol ⁻¹	<i>G/</i> kcal.mol ⁻¹	<i>S/</i> Cal.mol ⁻¹ K ⁻¹
S14	2	-834.188	-834.258	147.25	-834.064	-834.131	140.559	-834.057	-834.124	140.559
S10	2	-834.173	-834.249	160.153	-834.047	-834.118	151.186	-834.042	-834.114	151.186
S10/S14	3	-1328.67	-1328.77	208.98	-1328.48	-1328.58	199.07	-1328.47	-1328.57	199.07
S14	4	-1823.16	-1823.28	257.11	-1822.92	-1823.04	244.88	-1822.91	-1823.03	244.88
S10	4	-1823.14	-1823.27	267.11	-1822.90	-1823.03	256.81	-1822.89	-1823.01	256.81
S10/S14	5	-2317.64	-2317.79	318.23	-2317.34	-2317.49	301.58	-2317.33	-2317.47	301.58
S14	6	-2812.15	-2812.33	373.71	-2811.78	-2811.95	348.64	-2811.76	-2811.93	348.64
S10	6	-2812.13	-2812.32	386.25	-2811.76	-2811.93	361.78	-2811.74	-2811.92	361.78
S10/S14	7	-3306.61	-3306.82	429.97	-3306.2	-3306.39	408.23	-3306.18	-3306.37	408.23

^a Az S10 és az S14 szimbólum azt jelöli, hogy melyik H-kötött gyűrűből tartalmaz többet az adott elrendezés páros számú H-kötés esetén. A páratlan számú H-kötéssel rendelkező szerkezetekben e kétféle gyűrűből ugyanannyi található, így az S10/S14 jelölést használtuk.

8. táblázat: Termodinamikai függvények változása For-(Ala)_n-NH₂ (n=1-6) egységek dimerizációja során antiparallel β-redős szerkezet kialakulása esetén, különböző elméleti szinteken számítva.

Típus ^a	H-kötések	B3LYP/6-31G(d)			M05-2X/6-31G(d)			M05-2X/6-31G(d) CP		
		ΔH/ kcal.mol ⁻¹	ΔG/ kcal.mol ⁻¹	TΔS/ kcal.mol ⁻¹	ΔH/ kcal.mol ⁻¹	ΔG/ kcal.mol ⁻¹	TΔS/ kcal.mol ⁻¹	ΔH/ kcal.mol ⁻¹	ΔG/ kcal.mol ⁻¹	TΔS/ kcal.mol ⁻¹
S14	2	-17.28	-4.89	-12.31	-20.93	-7.97	-12.96	-16.54	-3.58	-12.96
S10	2	-7.87	0.65	-8.47	-9.89	-0.10	-9.79	-6.89	2.90	-9.79
S10/S14	3	-17.54	-4.88	-12.58	-22.62	-8.88	-13.74	-16.76	-3.02	-13.74
S14	4	-28.29	-12.18	-16.11	-36.54	-18.98	-17.57	-27.82	-10.25	-17.57
S10	4	-17.43	-4.30	-13.13	-24.33	-10.32	-14.01	-17.79	-3.78	-14.01
S10/S14	5	-28.16	-11.60	-16.56	-37.91	-18.74	-19.17	-28.41	-9.24	-19.17
S14	6	-38.70	-18.95	-19.63	-51.64	-28.71	-22.93	-39.28	-16.35	-22.93
S10	6	-28.13	-12.14	-15.89	-39.46	-20.44	-19.01	-28.79	-9.78	-19.01
S10/S14	7	-38.45	-18.06	-20.39	-53.03	-28.67	-24.36	-39.59	-15.22	-24.36

^a Az S10 és az S14 szimbólum azt jelöli, hogy melyik H-kötött gyűrűből tartalmaz többet az adott elrendezés páros számú H-kötés esetén. A páratlan számú H-kötéssel rendelkező szerkezetekben e kétféle gyűrűből ugyanannyi található, így az S10/S14 jelölést használtuk.

9. táblázat: Parallel [For-(Ala)_n-NH₂]₂ (n=1-6) β-redős szerkezetek termodinamikai függvényei különböző elméleti szinteken számítva.

Típus ^a	H-kötések ^b	M05-2X/6-31G(d)			M05-2X/6-31G(d) CP		
		H/ kcal.mol ⁻¹	G/ kcal.mol ⁻¹	S/ Cal.mol ⁻¹ K ⁻¹	H/ kcal.mol ⁻¹	G/ kcal.mol ⁻¹	S/ Cal.mol ⁻¹ K ⁻¹
S12	2	-834.064	-834.13	138.474	-834.057	-834.123	138.474
S12	3	-1328.48	-1328.58	191.39	-1328.47	-1328.56	191.39
S12	4	-1822.91	-1823.03	248.15	-1822.9	-1823.01	248.15
S12.	5	-2317.34	-2317.48	302.289	-2317.34	-2317.48	302.289
S12	6*	-2811.77	-2811.93	348.03	-2811.74	-2811.91	348.03
S12	7*	-3306.19	-3306.38	404.26	-3306.17	-3306.36	404.26

^a S12: 12 H-kötött gyűrűt tartalmazó, parallel szerkezet.

^b *: 1 imaginárius (negatív) frekvenciával rendelkező szerkezetek. Az ebből következő hiba elhanyagolhatónak bizonyult, mivel az entrópiában kisebb, mint 0,5 kcal/mol eltérés adódott.

10. táblázat: Termodinamikai függvények értékeiben bekövetkező változások a dimerizáció során parallel [For-(Ala)_n-NH₂]₂ (n=1-6) , valamint ezek átlaga antiparallel [For-(Ala)_n-NH₂]₂ (n=1-6) β-redős szerkezetek esetén, különböző elméleti szinteken számítva.

Típus ^a	H-kötések ^b	M05-2X/6-31G(d)			M05-2X/6-31G(d) CP		
		$\Delta H/$ kcal.mol ⁻¹	$\Delta G/$ kcal.mol ⁻¹	$T\Delta S/$ kcal.mol ⁻¹	$\Delta H/$ kcal.mol ⁻¹	$\Delta G/$ kcal.mol ⁻¹	$T\Delta S/$ kcal.mol ⁻¹
S12	2	-20.68	-7.09	-13.58	-16.24	-2.66	-13.58
S12	3	-23.17	-7.14	-16.03	-16.49	-0.46	-16.03
S12	4	-28.72	-12.13	-16.59	-20.11	-3.51	-16.59
S12.	5	-35.17	-16.21	-18.96	-24.49	-5.53	-18.96
S12	6*	-41.47	-18.35	-23.11	-28.56	-5.44	-23.11
S12	7*	-48.06	-22.51	-25.55	-32.67	-7.13	-25.55
Átlag	2	-15.41	-4.04	-11.37	-11.72	-0.34	-11.37
Átlag	3	-22.62	-8.88	-13.74	-16.76	-3.02	-13.74
Átlag	4	-30.44	-14.65	-15.79	-22.80	-7.01	-15.79
Átlag	5	-37.91	-18.74	-19.17	-28.41	-9.24	-19.17
Átlag	6	-45.55	-24.57	-20.97	-34.04	-13.06	-20.97
Átlag	7	-53.03	-28.67	-24.36	-39.59	-15.22	-24.36

^a S12: 12 H-kötött gyűrűt tartalmazó, parallel szerkezet. Átlag.: az S10 és az S10 antiparallel szerkezetekre kapott értékek átlagolva azonos H-kötés szám esetén.

^b *: 1 imaginárius (negatív) frekvenciával rendelkező szerkezetek. Az ebből következő hiba elhanyagolhatónak bizonyult, mivel az entrópiában kisebb, mint 0,5 kcal/mol eltérés adódott.

11. táblázat: Parallel [For-Ala-NH₂]_m (m=1-6) β-redős szerkezetek termodinamikai függvényei különböző elméleti szinteken számítva.

Típus ^a	Szálak	M05-2X/6-31G(d)			M05-2X/6-311++G(d,p)		
		<i>H</i> / kcal.mol ⁻¹	<i>G</i> / kcal.mol ⁻¹	<i>S</i> / Cal.mol ⁻¹ K ⁻¹	<i>H</i> / kcal.mol ⁻¹	<i>G</i> / kcal.mol ⁻¹	<i>S</i> / Cal.mol ⁻¹ K ⁻¹
-	1	-417,02	-417,06	92,01	-417,15	-417,20	92,01
S12	2	-834,06	-834,13	138,47	-834,34	-834,40	138,47
S12	3	-1251,10	-1251,20	192,58	-1251,51	-1251,60	192,58
S12.	4	-1668,14	-1668,26	244,75	-1668,69	-1668,80	244,75
S12	5	-2085,19	-2085,33	298,73	-2085,86	-2086,00	298,73
S12	6	-2502,23	-2502,39	349,75	-2503,04	-2503,20	349,75

^a S12: 12 H-kötött gyűrűt tartalmazó, paralel szerkezet.

12. táblázat: Antiparallel [For-Ala-NH₂]_m (m=2-6) β-redős szerkezetek termodinamikai függvényei különböző elméleti szinteken számítva.

Típus ^a	Szálak	M05-2X/6-31G(d)			M05-2X/6-311G++(d,p)		
		<i>H</i> / kcal.mol ⁻¹	<i>G</i> / kcal.mol ⁻¹	<i>S</i> / Cal.mol ⁻¹ K ⁻¹	<i>H</i> / kcal.mol ⁻¹	<i>G</i> / kcal.mol ⁻¹	<i>S</i> / Cal.mol ⁻¹ K ⁻¹
S14	2	-834,05	-834,12	151,19	-834,32	-834,39	151,19
S10	2	-834,06	-834,13	140,56	-834,34	-834,40	140,56
S10/S14	3	-1251,10	-1251,19	199,78	-1251,51	-1251,60	199,78
S14	4	-1668,13	-1668,25	259,72	-1668,68	-1668,80	259,72
S10	4	-1668,15	-1668,27	245,97	-1668,69	-1668,81	245,97
S10/S14	5	-2085,18	-2085,33	305,92	-2085,86	-2086,01	305,92
S14	6	-2502,22	-2502,39	364,80	-2503,03	-2503,21	364,80
S10	6	-2502,24	-2502,40	351,68	-2503,05	-2503,22	351,68

^a Az S10 és az S14 szimbólum azt jelöli, hogy melyik H-kötött gyűrűből tartalmaz többet az adott elrendezés páros számú szál esetén. A páratlan számú monoalanin-szálból álló szerkezetekben e kétféle gyűrűből ugyanannyit tartalmaznak, így az S10/S14 jelölést használtuk.

13. táblázat: Termodinamikai függvények értékeiben bekövetkező változások az oligomerizáció során parallel [For-Ala-NH₂]_m (m=2-6), valamint ezek átlaga antiparallel [For-Ala-NH₂]_m (m=2-6) β-redős szerkezetek esetén, különböző elméleti szinteken számítva.

Típus ^a	Szálak	M05-2X/6-31G(d)			M05-2X/6-311++G(d,p)		
		$\Delta H/$ kcal.mol ⁻¹	$\Delta G/$ kcal.mol ⁻¹	$T\Delta S/$ kcal.mol ⁻¹	$\Delta H/$ kcal.mol ⁻¹	$\Delta G/$ kcal.mol ⁻¹	$T\Delta S/$ kcal.mol ⁻¹
Átlag	2	-7,71	-2,02	-5,69	-6,91	-1,22	-5,69
Átlag	3	-10,74	-3,16	-7,58	-9,67	-2,09	-7,58
Átlag	4	-12,36	-3,77	-8,59	-11,11	-2,52	-8,59
Átlag	5	-13,33	-4,14	-9,19	-12,01	-2,81	-9,19
Átlag	6	-13,97	-4,34	-9,63	-12,57	-2,94	-9,63
S12	2	-10,34	-3,55	-6,79	-8,83	-2,04	-6,79
S12	3	-12,06	-3,77	-8,29	-10,59	-2,29	-8,29
S12	4	-12,99	-3,80	-9,19	-11,37	-2,18	-9,19
S12	5	-13,55	-3,93	-9,62	-11,87	-2,25	-9,62
S12	6	-13,93	-3,87	-10,05	-12,21	-2,16	-10,05

^a S12: 12 H-kötött gyűrűt tartalmazó, parallel szerkezet. Átlag.: az S10 és az S10 antiparallel szerkezetekre kapott értékek átlagolva azonos szálszám esetén.

14. táblázat: Parallel [For-(Ala)₂-NH₂]_m (m=1-6) β-redős szerkezetek termodinamikai függvényei különböző elméleti szinteken számítva.

Típus ^a	Szálak	M05-2X/6-31G(d)			M05-2X/6-311++G(d,p)		
		$H/$ kcal.mol ⁻¹	$G/$ kcal.mol ⁻¹	$S/$ Cal.mol ⁻¹ K ⁻¹	$H/$ kcal.mol ⁻¹	$G/$ kcal.mol ⁻¹	$S/$ Cal.mol ⁻¹ K ⁻¹
-	1	-664,22	-664,28	122,58	-664,44	-664,44	122,58
S12	2	-1328,48	-1328,58	191,39	-1328,90	-1328,90	191,39
S12	3	-1992,74	-1992,87	275,43	-1993,36	-1993,36	275,43
S12.	4	-2657,00	-2657,17	350,75	-2657,84	-2657,84	350,75
S12	5	-3321,26	-3321,46	427,32	-3322,30	-3322,30	427,32
S12	6	-3985,51	-3985,76	514,55	-3986,77	-3986,77	514,55

^a S12: 12 H-kötött gyűrűt tartalmazó, parallel szerkezet.

15. táblázat: Antiparallel [For-(Ala)₂-NH₂]_m (m=2-6) β-redős szerkezetek termodinamikai függvényei különböző elméleti szinteken számítva.

Típus ^a	Szálak	M05-2X/6-31G(d)			M05-2X/6-311G++(d,p)		
		H/ kcal.mol ⁻¹	G/ kcal.mol ⁻¹	S/ Cal.mol ⁻¹ K ⁻¹	H/ kcal.mol ⁻¹	G/ kcal.mol ⁻¹	S/ Cal.mol ⁻¹ K ⁻¹
S10/S14	2	-1328,48	-1328,58	199,07	-1328,90	-1329,00	199,07
S10/S14	3	-1992,75	-1992,88	275,64	-1993,38	-1993,51	275,64
S10/S14	4	-2657,01	-2657,18	354,48	-2657,85	-2658,02	354,48
S10/S14	5	-3321,27	-3321,47	427,79	-3322,32	-3322,52	427,79
S10/S14	6	-3985,53	-3985,78	507,67	-3986,79	-3987,03	507,67

^a Az S10 és az S14 szimbólum azt jelöli, hogy melyik H-kötött gyűrűből tartalmaz többet az adott elrendezés. A dialanin-százból álló szerkezetek az S10 és az S14 gyűrűből ugyanannyit tartalmaznak, így az S10/S14 jelölést használtuk.

16. táblázat: Termodinamikai függvények értékeiben bekövetkező változások az oligomerizáció során parallel [For-(Ala)₂-NH₂]_m (m=2-6), valamint ezek átlaga antiparallel [For-(Ala)₂-NH₂]_m (m=2-6) β-redős szerkezetek esetén, különböző elméleti szinteken számítva.

Típus ^a	Szálak	M05-2X/6-31G(d)			M05-2X/6-311++G(d,p)		
		ΔH/ kcal.mol ⁻¹	ΔG/ kcal.mol ⁻¹	TΔS/ kcal.mol ⁻¹	ΔH/ kcal.mol ⁻¹	ΔG/ kcal.mol ⁻¹	TΔS/ kcal.mol ⁻¹
S10/S14	2	-11,31	-4,44	6,87	-10,23	-3,36	6,87
S10/S14	3	-15,48	-6,33	6,33	-13,99	-4,84	9,15
S10/S14	4	-17,77	-7,65	10,12	-16,06	-5,94	10,12
S10/S14	5	-19,12	-8,08	11,04	-17,28	-6,25	11,04
S10/S14	6	-20,02	-8,70	11,32	-18,05	-6,73	11,32
S12	2	-11,58	-3,57	8,01	-9,90	-1,89	8,01
S12	3	-13,54	-4,37	4,37	-11,78	-2,61	2,61
S12	4	-16,36	-5,96	10,40	-14,42	-4,02	10,40
S12	5	-17,42	-6,36	11,07	-15,26	-4,19	11,07
S12	6	-17,77	-6,79	10,98	-15,63	-4,65	10,98

^a S12: 12 H-kötött gyűrűt tartalmazó, parallel szerkezet.. Az S10 és az S14 szimbólum azt jelöli, hogy melyik H-kötött gyűrűből tartalmaz többet az adott elrendezés. A dialanin-százból álló szerkezetek az S10 és az S14 gyűrűből ugyanannyit tartalmaznak, így az S10/S14 jelölést használtuk.