

A kémia újabb eredményei

1994

Perczel András · Laczkó Ilona ·
Hollósi Miklós

Peptidek térszerkezet-vizsgálata

Akadémiai Kiadó · Budapest

29786 ↓

A KÉMIA ÚJABB EREDMÉNYEI

ÚJABB EREDMÉNYEI

CZÁR VÁRI BELA

TÜDŐS FERENC
NAGY LAJOS GYÖRGY, PUNGOR ERNŐ, SZANTAY CSABA,
HARGITTAI ISTVÁN, HOLCZ JÁNOS, MARKÓ LÁSZLÓ,
BLICSE TIRON, BURGER KÁLMÁN, GÖRÖG SÁNDOR.



MTRC



TEKINTSEMEK (KÖNYV-ÉRTÉK)

A KÉMIA ÚJABB EREDMÉNYEI

77. kötet

Szerkeszti

CSÁKVÁRI BÉLA

A szerkesztőbizottság tagjai

BLICKLE TIBOR, BURGER KÁLMÁN, GÖRÖG SÁNDOR,
HARGITTAI ISTVÁN, HOLLÓ JÁNOS, MARKÓ LÁSZLÓ,
NAGY LAJOS GYÖRGY, PUNGOR ERNŐ, SZÁNTAY CSABA,
TÚDÓS FERENC



AKADÉMIAI KIADÓ · BUDAPEST

PEPTIDEK TÉRSZERKEZET-VIZSGÁLATA

PERCZEL ANDRÁS
LACZKÓ ILONA
HOLLÓSI MIKLÓS

Előszó

Bevezetés

1. A peptidkémia története
2. Polipeptidok előállítása és tisztítása
3. A peptid kromatográfiája
4. Tér szerkezeti felépítés a molekuláris szerkezet meghatározásának (módszerek) CD-módszere
- 5.1. A α -helix
- 5.2. A β -redőzet
- 5.3. A β -sheet szerkezetek
- 5.4. A polipeptid II. szerkeze
- 5.5. Az aminosavak és aminosavak szerkezetének
6. Az aminosavak és aminosavak szerkezetének
7. A molekuláris szerkezet meghatározásának
8. Polipeptidok szerkezetének meghatározásának
9. Az FT-IR módszer
- 10.1. Molekuláris szerkezet
- 10.2. Felépítés a polipeptid szerkezetének
- 10.3. Felépítés a polipeptid szerkezetének
- 10.4. A β -sheet szerkezet
11. A molekuláris szerkezet meghatározásának
12. Peptidok konformációjának
13. Konformációjának meghatározásának
- 14.1. Peptidok konformációjának
- 14.2. Peptidok konformációjának

229805
PEPTIDEK
TÉRSZERKEZET-VIZSGÁLATA

PERCELI ANDRÁS
LACZKÓ ILONA
HOLLÓSI MIKLÓS

ISBN 963 25 6774 1

Kiadja az Akadémiai Kiadó
1117 Budapest, Frolové Kornélia u. 19-25.

© Perceli András, Laczkó Ilona, Hollósi Miklós, 1994

Minden jog fenntartva, beleértve a sokszorosítást, a nyilvános előadást, a rádió- és televíziós közvetítést, valamint a fordítás jogát, az egyes fejezetekről kivételül.

A kiadást Miklós az Akadémiai Kiadó és Nyomda Vállalat igazgatja.
A nyomdai munkálatait az Akadémiai Kiadó és Nyomda Vállalat végzi.

Felkiadás éve: 2004 Pécs

Budapest, 1994

Felkiadás szerkesztő: Nagy Tibor

Művelődési munkatárs: Maros András

A kiadást szerkesztő: László Éva

Nyomdai munkatárs: 2006

Megjelenés: 10.11. (A/1) 19. kiadásban

Kiadóhely: 1117

HU 9634 6774 1/1

Printed in Hungary

M. TUD. AKADEMIA KÖNYVTÁRÁ
Könyvleltár ...422.../1995. sz.

TARTALOM

Előszó	11
Bevezetés	15
1. A peptidkonformáció fogalma és leírása	23
2. Polipeptidek cirkuláris dikroizmus spektroszkópai vizsgálata	38
2.1. A peptid kromofor kiralitása	41
2.2. Térszerkezeti hatások: a másodlagos szerkezeti típusok (konformációk) CD-spektruma	43
2.2.1. Az α -hélix	43
2.2.2. A β -redőzött réteg (β -konformáció)	45
2.2.3. A β -turn szerkezetek (β -kanyarok)	48
2.2.4. A poli(prolin)-II hélixek	53
2.2.5. Az aperiodikus (rendezetlen) konformáció	54
2.3. Az aromás és diszulfid kromoforok optikai aktivitása	55
2.4. A másodlagos szerkezet meghatározása a CD-spektrum alapján	56
3. Polipeptidek térszerkezetének vizsgálata Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia segítségével	63
3.1. Az FT-IR módszer főbb alkalmazási területei	67
3.1.1. Membránfehérjék	67
3.1.2. Fehérjék és peptidek kölcsönhatása micellákkal	69
3.1.3. Fehérjék és peptidek oldatban kialakult konformációjának vizsgálata	71
3.1.4. A β -turn szerkezetek FT-IR-spektroszkópai azonosítása	75
3.2. A vibrációs cirkuláris dikroizmus (VCD) spektroszkópia	81
4. Peptidek konformációanalízise NMR-spektroszkópia segítségével	83
4.1. Konformációanalízis nukleáris Overhauser effektus (NOE) módszerek segítségével	91
4.1.1. Peptidek jellegzetes ^1H - ^1H távolságai	91
4.1.2. Peptidek kvantitatív konformációanalízise NOE módszerek segítségével	94

4.1.3.	Kis peptidekben megfigyelt konformációs specifikus ^1H — ^1H távolságok	101
4.1.3.1.	Gerinckonformáció meghatározása szekvenciális (rövid távú) NOE-k alapján	101
4.1.3.2.	Gerinckonformáció meghatározása nemszekvenciális NOE-k alapján	107
4.1.3.2/A.	β -Kanyarok	110
4.1.3.2/B.	α -Hélix, a β -redőzött réteg és nyújtott szerkezet	116
4.2.	Peptidkonformáció meghatározása csatolási állandókból	119
4.3.	Peptidkonformáció az amidprotonok kémiai eltolódásának tükrében	120
5.	Peptidek konformációanalízise a röntgenkristallográfia tükrében	122
5.1.	Peptidek szilárd fázisú szerkezete	125
5.2.	Peptidkonformációk a fehérjékről készült röntgenkristallográfia tükrében	134
5.3.	Fehérjék térszerkezete a peptidkonformációk alapján	136
6.	Elméleti módszerek	143
6.1.	Szélsőérték-keresési eljárások	144
6.1.1.	A többdimenziós konformációanalízis	150
6.1.2.	Szélsőérték-meghatározó algoritmusok	158
6.2.	Energiafüggvények	160
6.3.	Di- és tripeptidek konformációanalízise	165
6.3.1.	Peptidkonformációk molekuláris mechanika, valamint félempirikus módszerek alapján	167
6.3.2.	Peptidtérszerkezetek ab initio számítása	173
6.4.	Hosszabb peptidláncok konformációs lehetőségei	188
7.	Peptidek térszerkezet-vizsgálata spektroszkópiai és számítástechnikai módszerek együttes alkalmazásával	193
	Irodalom	198

RÖVIDÍTÉSEK

1D: egydimenzió

nD: n -dimenzió

α (hkl): a szerkezeti tényező fázisa

a. u. (atomic unit): atomi egységrendszer, amely értelmében az elektron töltése (e), nyugalmi tömege (m), valamint a Planck-állandó (h) értéke egységnyi ($e = 1$, $m = 1$ és $h = 1$)

δ -Ava: 5-amino-valeriánsav

ϵ -Aca: 6-amino-kapronsav

BPSD (Brookhaven Protein Structure Data bank): Fehérjekrisztallográfiai adatbázis

CD: cirkuláris dikroizmus

CNDO (Complect Neglect of Differential Overlap): a „két különböző atompálya” átfedési integráljainak teljes körű elhanyagolásán alapuló energiameghatározási módszer

COSY (Correlated Spectroscopy): korrelált NMR-spektroszkópia

DG: Distance Geometry

egykristály: megfelelő számú koherens rácspont

EHT (Extended Hückel theory): Extended Hückel-elmélet

ECEPP (Empirical Conformational Energy Program for Peptides): peptidekre parametrizált MM alapú konformációs program

f_n : atomi szórástényező

F (hkl): szerkezeti tényező vagy struktúrfaktor

FID (Free Induction Decary): interferogram

FT-IR: Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia

hartree: az energia atomi egysége (627,51 kcal/mol)

HF: Hartree—Fock-eljárás

HT (Hückel theory): Hückel-elmélet

HOHAHA (Homonuclear Hartman Hahn spectroscopy): ugyanaz, mint a TOCSY

INDO (Intermediate Neglect of Differential Overlap): a „két különböző atompálya” átfedési integráljainak részleges elhanyagolásán alapuló energiameghatározási módszer

konformáció: nem minimális energiájú térszerkezet

konformer: minimális energiájú térszerkezet

konstitúció: a molekulákat felépítő atomok kapcsolódási sorrendje

MINDO (Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap): a „két különböző atompálya” átfedési integráljainak módosított elhanyagolásán alapuló energiameghatározási módszer

NOE: nukleáris Overhauser-effektus

NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy): nukleáris Overhauser-spektroszkópia

MM: molekuláris mechanika

MD: molekuláris dinamika

MKA: multidimenzionális konformációanalízis

PEF: potenciális energiafelszín

PEHF: potenciális energia kiperfalszín

PEG: potenciális energiagörbe

PCILO (Perturbative Configurational Interaction using Localized Orbitals): lokalizált molekulapályákon végzett perturbációs jellegű energiameghatározás

RELAY (Relayed coherence transfer experiment) vagy RELAYED-COSY: relé, amely egy módosított COSY-típusú pulzusszekvencia, amely során a COSY-keresztcsúcsok mellett a RELAY-keresztcsúcsok is megfigyelhetők

rf: rádiófrekvencia

ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy): Overhauser-spektroszkópia forgó koordináta-rendszerben

SCF (self consistent field): önkonzisztens tér

T_1 (longitudinal relaxation time vagy spin-lattice relaxation time): longitudinális relaxációs sebesség. A nem szelektív „rf” pulzus következtében megbomlott termodinamikai egyensúly helyreállításának sebessége

T_2 (transverse relaxation time vagy spin-spin relaxation time): A nem szelektív „rf” pulzus hatására mérhető interferogram (FID) csökkenésének az (x, y) síkban mérhető sebessége

TOCSY (Total Correlation Spectroscopy): teljesen korrelált NMR-spektroszkópia

ELŐSZÓ

A *sztereokémia* néhány évtizeddel ezelőtt még a kémia egyik speciális, kevesek által ismert és művelt területe volt, ma már maga a kémia. A természetes szénvegyületek, fémkomplexek, polimerek, de bármilyen nemlineáris molekula szerkezetének, tulajdonságainak és reakciókészségének megismerése elképzelhetetlen a térkémi viszonyok tanulmányozása nélkül. Fokozottan érvényes ez a megállapítás az életfolyamatok kutatásával foglalkozó tudományterületekre: a biokémiára, biofizikára és általában a molekuláris biológiára. Ez az egész, alig 50 éves múltra visszatekintő és az enzimek és az anyagcsere-folyamatok kémiájának tanulmányozásából kialakult terület, amelyet az *élettudományok* (life sciences) gyűjtőnév szerencsésen és találóan foglal össze, ma robbanásszerű fejlődésen megy keresztül. Ez vitathatatlanul a DNS-kutatások legújabb, látványos és nyilvánvaló elméleti és gyakorlati hasznát hozó eredményeinek köszönhető. Ezért azonosítják sokan a nukleinsav-kutatásokat a molekuláris biológiával.* Az anyag molekuláris szerveztségének legmagasabb szintjét a fehérjék képviselik. A fehérjekémia kialakulásához az enzimek adták az első ösztönzést, de ma már nyilvánvaló, hogy a fehérjék jelentik csaknem minden biológiai rendszer és folyamat megismerésének kulcsát a sejtmembránoktól egészen az agyműködésig. A DNS-kutatások és a géntechnológia célja sem más, mint a fehérjék — és tágabb értelemben a fehérjét csaknem mindig tartalmazó molekulakomplexek — szerkezetének módosítása vagy átalakítása.

Bruckner Győző a bakteriális eredetű γ -poliglutaminsavak vizsgálatának beindításával a kémia egy új határterületének, a *peptidkémia*nak az alapjait rakta le Magyarországon. A peptidek a fehér-

* A molekuláris biológián ma inkább a nukleinsavkutatásokat és az azokból kiterébélyesedő és lényegében a rekombináns DNS-technikán alapuló géntechnológiát és biotechnológiát értjük, de a két szó együttese tágabb értelemben bármely természetes vegyület, biológiai rendszer vagy folyamat molekuláris szintű megismerését és leírását jelenti.

jéktől csak méretükben, vagyis építőköveik, az aminosavak számában különböznek. Tulajdonságaik sok tekintetben hasonlítanak a fehérjékhez, ezért előállításuk és vizsgálatuk kezdettől fogva a fehérjék tulajdonságainak megismerésére is irányult. A *peptidhormonok* biológiai jelentőségének felismerése és a humán ACTH szintézisével kapcsolatos, 1970-ben Állami Díjjal jutalmazott kutatások vezettek a hazai peptidkémiai műhelyek kialakulásához. A peptidkémia egyik alapvető célkitűzése a szerkezet és hatás közötti összefüggések vizsgálata. A *szerkezet* kezdetben csaknem kizárólag az elsődleges szerkezetet, vagyis az aminosavsorrendet jelentette. Mivel azonban a fehérjék másod-, harmad- és negyedleges molekuláris szervezettségét, vagyis *térszerkezetét* kizárólag az aminosavsorrend határozza meg (kódolja), a szerkezet-hatás vizsgálatok szükségszerűen elvezettek a térszerkezet jelentőségének felismeréséhez.

A helikális fehérjék jellemző optikai forgatóképességének felismerésével a kiroptikai spektroszkópia két válfaja, az *optikai rotációs diszperzió* (ORD), és egyre inkább a *cirkuláris dikroizmus* (CD) spektroszkópia a másodlagos szerkezet (konformáció) vizsgálatának nélkülözhetetlen eszközévé vált. Az MTA Enzimológiai Intézetében és az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén üzembe helyezett ORD készülékek, majd az utóbbi intézményben 1974-től működő dikrográf (Roussell—Jouan III) úttörő szerepet játszottak a hazai térszerkezet-analitikai kutatásokban is.

Az elmúlt 30 év alatt a peptidek és fehérjék térszerkezet-vizsgálata óriási fejlődésen ment keresztül. A molekulatömeg és az alaki tulajdonságok vizsgálatára alkalmas módszereket (ultracentrifugálás, fényszórás mérése stb.) egyre inkább felváltották az atomi felbontású információt szolgáltató spektroszkópiái technikák. Jelentős növekedést mutat a térszerkezet kutatásával foglalkozó, évente megjelenő publikációk száma. Míg az NMR-spektroszkópiái munkák száma 1965 előtt évente alig 30 volt, addig 1980 után már évi 500—1000 közlemény jelent meg. A teljes szakirodalom napjainkig több tízezerre becsülhető.

A fehérjék térszerkezetével kapcsolatos ismereteink ma már néhány száz fehérjekristály röntgenkrisztallográfiai analízisen nyugszanak. Ezt az óriási és a különböző adatbankokon keresztül mindenki számára hozzáférhető információt az oldatban kialakuló konformáció vizsgálatára használt spektroszkópiái eljárások (CD, IR, NMR stb.) által szolgáltatott ismeretanyag egészíti ki. Így

— míg a harmadlagos és főleg a negyedleges szerkezet kialakulásáért felelős törvényszerűségeket ma még alig ismerjük — a másodlagos szerkezet, vagyis a konformáció fogalma tisztázott, minőségi és mennyiségi jellemzése megoldottnak tekinthető. Ezért minden szempontból aktuálissá vált egy olyan magyar nyelvű monográfia megírása, amely részletesen tárgyalja a peptidek és fehérjék térszerkezetét, a térszerkezet-vizsgálat jelenleg használt módszereit és azok teljesítőképességét.

Jelen munka fő célkitűzése az, hogy a vizsgálati módszerek áttekintésén keresztül megismertesse az olvasót a peptidek és fehérjék térszerkezetének fogalmával, a térbeli molekuláris szerveződés különböző szintjeivel és a térszerkezet leírásával. Bevezető olvasmányként NÓGRÁDI MIHÁLY „Sztereokémia” c. könyvét [1], ELŐDI PÁL „Biokémia” c. tankönyvének 1989-es kiadását [2] és mindenekelőtt BRUCKNER GYÖZÖ „Szerves Kémia” c. munkája I/2 kötetének [3] „Aminosavak, peptidek és fehérjék” c. alfejezetét ajánljuk. Ez utóbbinak a peptidkonformációval foglalkozó része a néhai KAJTÁR MÁRTON, a kiroptikai spektroszkópia és alkalmazott sztereo-kémia hazai úttörőjének munkája. A sztereo-kémia alapfogalmait ismertnek tételezzük fel és nem ismételjük meg a fenti könyvfejezet idevonatkozó, történeti áttekintést nyújtó részeit sem.

A munka címe *peptidek* térszerkezetének vizsgálatát ígéri. Ez a címválasztás mentesítette a szerzőket a fehérjéssel foglalkozó, ha lehet még bővebb és szerteágazóbb irodalom részletes áttekintésétől. A vizsgálati módszereket előtérbe állító közelítésnél sok esetben előnyösebbnek tűnt a példákat a fehérjék helyett a kisebb, könnyebben áttekinthető szerkezetű kis és közepes tagszámú peptidek köréből választani. Ez a mérettartomány az elmúlt években egyre inkább az érdeklődés középpontjába került, hiszen a szilárd fázisú peptidszintézis elválasztástechnikai és szerkezetazonosítási problémák nélkül max. 40—50 aminosavrészből felépített peptidek előállítását teszi lehetővé. A peptidek és fehérjék közötti határ nem húzható meg élesen, másrészt a „kis expozíciós idejű” elektron- és rezgési spektroszkópiai módszerek elvben ugyanúgy alkalmazhatók a rögzítettebb térszerkezetű fehérjékre, mint a mozgékonyabb peptidekre. Ez indokolja azt is, hogy a 2. fejezet (Polipeptidek cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai vizsgálata) és a 3. fejezet (Polipeptidek térszerkezetének vizsgálata Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia segítségével) nem választja szét élesen a fehérjéket és a peptideket.

A 2. és 7. fejezet Hollósi Miklós, a 3. fejezet Laczkó Ilona és Hollósi Miklós, az 1., 4., 5. és 6. fejezet pedig Perczel András munkája. A szerkesztés, valamint az ábrák összeállítása ugyancsak Laczkó Ilona érdeme. A munka szorosan kapcsolódik a „Kémia újabb eredményei” c. sorozat peptidszintézissel és peptidválasztás technikával foglalkozó korábbi és újabb köteteihez. Nem tekintetük feladatunknak a spektroszkópai módszerek elméleti és gyakorlati alapjainak ismertetését. A szerzők fontosnak tartották a *számítástechnikai* módszerek elméletét és alkalmazását bemutató 6. fejezet beiktatását. A modellezés a polipeptidek térszerkezetvizsgálatában kezdettől fogva fontos szerepet játszott, de a nagy szabadsági fokú, mozgékony térszerkezetű peptidek esetében is alkalmazható Dreiding (vagy azzal egyenértékű) modellkészletek csak kevés helyen álltak rendelkezésre. A személyi számítógépek elterjedésével ma már mindenki számára hozzáférhetők a megjelenítés, ábrázolás és az elméleti közelítés különböző szintű és hatékonyságú módszereit kínáló programcsomagok. A 6. fejezet ezek kiválasztásához és kritikus használatához is segítséget kíván nyújtani.

A könyvet mindazok figyelmébe ajánljuk, akiket érdekel az életfolyamatok legfontosabb molekuláinak, a fehérjéknek és peptideknek a térszerkezete, amelynek ismerete nélkül ma már a biológiai funkció tanulmányozása és megértése sem képzelhető el.

BEVEZETÉS

Az anyag belső szerkezetére vonatkozó korai flogisztonelemlélet alapján a XIX. század elején számos kísérleti eredmény már nehezen volt megmagyarázható. Elsősorban Berzeliusnak köszönhetően megszületett az elektrosztatikus alapokon nyugvó dualisztikus szerkezetértelmezési elmélet, amelyet lineáris vagy **egydimenziós** (1D) „szerkezetleírási szintnek” is tekinthetünk. (Berzelius szerint az ellentétes elektromos töltésű atomok, illetve atomcsoportok közötti elektrosztatikus vonzás tartja össze a molekulát. Ez az elmélet — bár részben igaznak bizonyult — például már az O_2 -molekula létezését sem tudta értelmezni.) Nem sokkal később bizonyítást nyert, hogy a szénatomok közvetlenül egymással is összekapcsolódhatnak hosszabb láncokká és gyűrűkké (KEKULÉ 1865). Így Kekulé, Butlerov és Couper elsőként megalkották a vegyérték fogalmát, amely a telítetlen gyűrűs szénhidrogének (pl. benzol) szerkezetének megértése során megteremtette a „sík-kémia” alapjait. Ezt a molekulák **kétdimenziós** (2D) leírási szintjeként foghatjuk fel. A síkkémian nyugvó és azt kizárólagossá tevő Baeyer-féle feszülési elmélet (1885) — amely szerint a gyűrűs alkánok szénatomjai mind egy síkban helyezkednek el — hamarosan azonban tarthatatlanná vált. Sachse (1892) égéshő adatok segítségével rámutatott arra, hogy például a ciklohexán téralkata esetében nem ragaszkodhatunk a síkalkathoz. VAN'T HOFF ÉS LE BELL (1874) korábbi tetraéderes ligandumtér elmélete nyomán a XIX. század végére már lefektették a „térkémia” alapjait. Szinte érthetetlen, hogy mindezek után széles körben csak e század közepére vált elfogadottá a molekulák **háromdimenziós** (3D-s) „térkémiai” szemlélete. Az idők során az újabb és újabb kísérleti tények hatására egyre fejlődött a molekulákról alkotott modell, s ma már aligha vitatja bármely kémikus a molekulák háromdimenziós karakterét.

Az elmúlt száz év alatt ismertté vált, hogy bizonyos kötések mentén szerkezeti izomerek alakulhatnak ki, mint például a geometriai vagy cisztransz izoméria, mely során egyazon konstitúciójú

molekulához már egynél több téralkat rendelhető. A különböző geometriai elrendeződéseket potenciális energiagátak választják el, amelyek értéke szabja meg, hogy adott hőmérsékleten izomerekről vagy konformerekről beszélünk. Ha a gátmagasság alacsony, akkor különböző szerkezetek egyensúlyi rendszerével találjuk magunkat szemben, ahol a konformerekhez tartozó energiaszintek betöltöttsége a Boltzman-eloszlásnak megfelelő. Sztochasztikus felfogás szerint a rendszer egyfajta bolyongását képzeljük el a konformációs altéren, s ezért a **negyedik dimenziót** megtestesítő idő fogalmát is be kell vezetnünk. Az idő mint új változó bevezetésével a molekulák pontos szerkezetleírása már csak a négydimenziós (4D) térben képzelhető el. Ezért sztochasztikus modell esetén egy idő jellegű mennyiség, míg a Boltzman-féle determinisztikus leírás-módot alkalmazva egy valószínűségi változó bevezetése szükséges a molekulák térbeli jellegét leíró koordináták mellett. Mivel egy N atomból álló molekula geometriai adatait $(3N-6)$ úgynevezett „belső-koordináta” segítségével tudjuk megadni, ezért a következőképpen képzelhetjük el egy molekula konformációanalízisét. Képzeljük magunkat egy 6 dimenziós forgó-transzlációs koordináta-rendszerbe, s innen szemléljük az időben zajló, $(1N-6)$ dimenziójú molekulán belüli atomi szintű történést, amely maga a molekuláris konformációváltozás. Csak így alkothatunk hiteles képet azon molekulák szerkezetéről, amelyek adott körülmények között konformerek dinamikus egyensúlyi elegyeként vannak jelen. Ilyen szerves molekulák például az oligopeptidek vagy a hosszabb aminosav-láncból felépülő polipeptidek.

A fehérjék elsődleges szerkezetét, azaz a peptidláncot felépítő aminosavak sorrendjét a megfelelő DNS-szekvencia (genetikai kód) egyértelműen meghatározza. A natív fehérjék térszerkezete többé-kevésbé állandó, melyet befolyásol a primer szekvencia megváltoztatása. SCHELLMAN és munkatársai [4] korai definíciója értelmében a fehérjék 3D-szerkezetének legalább négy szerveződési szintjét különböztethetjük meg: úgymint *elsődleges*, *másodlagos*, *harmadlagos*, valamint *negyedleges* szerkezet. Peptidek esetében nem indokolt a másodlagos és harmadlagos szerkezet közötti éles határ meghúzása, mert egyrészt a térszerkezet kategorizálása önmagában is hordoz önkényes vonásokat, másrészt kis peptidek esetében a szekvencia méretéből következően az alegységek rendeződéséről általában nem beszélhetünk. ANFINSEN [5] híres kísérlete óta tudjuk, hogy számos esetben, ha a denaturáció körülményeit

megszüntetjük és a természetes környezetet visszaállítjuk, úgy a fehérje ismét felveszi eredeti téralakját. Nem ismeretes azonban olyan összefüggés, amely megadná azt, hogy a genetikai kód milyen módon determinálja a térszerkezetet. Az aminosavszekvencia szerkezetmeghatározó „titkának”, azaz a predikció problémájának megoldása hatalmas áttörést eredményezne a kémia és az élettudományokban. Fölvetődik azonban az a kérdés, hogy mi is valójában a fehérje-térszerkezet, amelyet már COREY és PAULING [6, 7], VENKATACHALAM [8], RAMACHANDRAN és mások [9, 10] mintegy ötven évvel ezelőtt kezdtek el vizsgálni, valamint az, hogy milyen fizikokémiai módszerek segítségével ismerhető meg ezen molekulák konformációja? A kérdés első részére „globális” válasz adható, mivel egyetlen konformert tartalmazó molekula térszerkezete nem más, mint a molekula atomjainak térbeli helyzete. Ha a molekulában N atom található, akkor azok térbeli helyzete $3N$ Descartes-koordinátával vagy $3N-6$ belső koordináta segítségével írható le egyértelműen. Nem redundáns belsőkoordináta-készletből egynél több is megadható ugyanarra az atommag konfigurációra, ám konformációs szempontból célszerű megadni $(N-1)$ kötэшossz, az $(N-2)$ kötэшszög és az $(N-3)$ torziószög belső koordinátákat. A kérdés második részére viszont, amely arra vonatkozott, hogy valós rendszerek esetében ezek az adatok milyen módon határozhatók meg, egyértelmű válasz nem adható. Különösen összetetté akkor válik a probléma, ha a molekula csak több konformer egyensúlyi keveréként írható le. Ilyen konformációs probléma megoldását nem egyetlen módszer kizárólagos alkalmazása, hanem a különböző spektroszkópiai eljárások eredményeiből kiolvasott információ-mozaikok gondos összerakása jelenti.

Ha a polipeptidek méretük és kémiai jellegük révén fehérjefragmensekként foghatók fel, úgy felvetődhet az olvasóban az a jogos kérdés, vajon miért nem elegendő csupán a fehérjék térszerkezet-meghatározásánál szokásos módszereket alkalmazni. Számos spektroszkópiai eljárás mindkét területen sikerrel alkalmazható. Paradox módon a nagyobb rendszerek térszerkezet-vizsgálata, amely akár 50 vagy 100 aminosav térbeli helyzetének meghatározását jelenti, sok esetben egyszerűbb feladat, mint a rövidebb fragmensek konformációanalízise. Jóllehet a szekvencia hosszának növelése a probléma megoldhatóságát egyértelműen korlátozza, fehérjékben gyakran megfigyelhető a szerkezet „önmerevítő” hatása. A polipeptidlánc hosszának rövidülésével javul ugyan a módszerek

„feloldóképessége”, ám egyidejűleg a molekulák egyre inkább elvezítik „önmeghatározó” jellegüket. Ennek következtében a környezet szerkezetbefolyásoló hatása megnő, és a molekulák viselkedésének dinamikus jellege egyre kifejezettebbé válik. Röviden azt mondhatjuk tehát, hogy míg a nagy molekulák esetében az alapvető gondot az aminosavak azonosítása jelenti (*szekvenciális hozzárendelés*), addig az oligo- és polipeptidek (5—30 aminosav) vizsgálata során a konformációs mozgékonyág szab elsősorban határt a megismerésnek. Az NMR-spektroszkópia alkalmazása esetén így érthetővé válik például, hogy míg a polipeptidek és fehérjék esetében elengedhetetlen a nagy mágneses térerő (500—700 MHz) alkalmazása, addig kisebb peptidek térszerkezet-analízisének elsősorban a módszertani „paletta szélesítése” a feladat. Konformerkeverékek dinamikus viselkedéséből, valamint a környezeti hatások okozta sokféleségből esetenként előny kovácsolható. Éppen a környezeti hatások által előidézett változások jelenthetik a rendszer konformációanalízisének kulcsát, hiszen a celszerűen megválasztott oldószer, hőmérséklet, koncentráció, ionerősség és egyéb „környezeti” tényezők befolyásolják a konformációs egyensúlyt, amely egyik vagy másik konformer feldúsulásához vezethet. Ez teszi lehetővé egyes esetekben az adott állapot részletekbe menő jellemzését is.

A rohamosan fejlődő oldatfázisú konformációanalízis eredményeként ma már több tucat toxin, peptidhormon és kisebb fehérje oldatban kialakuló térszerkezete hozzávetőlegesen ismert. Számos metodikai probléma mellett alapvető jelentőségű az alkalmazott spektroszkópiai módszer időskálája. A vizsgálandó molekulák dinamikus jellegéből eredően a spektroszkópiai módszerek két családba sorolhatók: úgymint a karakterisztikus konformációs átalakulás sebességénél ($10^{-1} \leq \leq 10^{-9}$) lassabb, és ennél a sebességnél gyorsabb időskálájú eljárások (lásd 1. séma).

A kötéshosszak nyújtásával, illetve a kötésszögek torzulásával járó molekuláris mozgások gyorsak; a fempto- (10^{-15} s), illetve a pikoszekundum (10^{-12} s) időtartományába esnek. A sztérikusan gátolt vagy konformációsán árnyékolt torziószögek megváltozása hasonlóan rövid ideig tartó mozgástípus. Ezen utóbbi szerkezetváltozás hajtóereje elsősorban nem az adott erőállandó nagyságában rejlik, hanem a megfelelő effektív erő méretében, amely elsősorban a molekula belsejében fellépő van der Waals-féle taszításokból ered, mivel ez a távolság csökkenésével rohamosan nő ($[r-r_0]^{-12}$). (A triptofán fluoreszceins spektroszkópiai vizsgálatá-

Időskála (s ⁻¹)	Amplitúdó (Å)	Előfordulás
rövid: 10 ¹⁵ —10 ¹²	kis 10 ⁻³ —10 ⁻¹	kötéshossz megnyúlás gátolt torzió megváltozása
közepes: 10 ¹² —10 ⁹	kis 10 ⁻¹ —10 ¹	felszíni oldalláncok, árnyékolatlan felszíni hurkok mozgása
hosszú: 10 ⁹ —10 ⁶	kis 10 ⁰ —10 ²	peptidek gombolyodása α-hélix-rendezetlen átmenetek és árnyékolt gyűrűk konformációs mozgása
igen hosszú: 10 ⁶ —10 ¹	kis 10 ¹ —10 ²	fehérjék gombolyodása

1. séma

nak tanúsága szerint ilyen nagysebességű torziószög-változások figyelhetők például meg az RNase T₁ fehérje belsejében.) Az FT-IR spektroszkópia, amely időskálája a femtoszekundum tartományba esik, illetve a még ennél is rövidebb időskálájú CD a konformációs mozgásokat elvileg „külön” érzékeli. Az NMR-spektroszkópiai eljárások, az alkalmazott rezonanciafrekvencia jellegéből következően általában a „lassúbb” időskálájú kategóriába esnek, s ezért gyakran a konformerkeverékek súlyozott átlagát határozzák meg. A molekuláris forgás, valamint az alegységek konformációs átalakulása eredményezte molekuláris mozgást a T₁ és T₂ relaxációs paraméterek értékei jelenítik meg. Sok esetben, a probléma összetettsége miatt, egyszerre több spektroszkópiai eljárás (CD, FT-IR, és FT-NMR) alkalmazása látszik célszerűnek, és csak ezekre együtt alapozva érdemes térszerkezeti következtetéseket levonni.

A cirkuláris dikroizmus (CD) egyszerű és gyors spektroszkópiai módszer [11, 12], amely közvetlen információt szolgáltat a királis környezetben levő kromoforok térbeli elhelyezkedéséről [13, 14]. A peptidek és fehérjék térszerkezet-analízise során a rutinszerűen vizsgált spektrális tartományból (240—185 nm) nyerhető információ az amidcsoportok relatív térbeli elhelyezkedésével hozható kapcsolatba [14]. A módszer nagyfokú érzékenységére jellemző, hogy akár 15—30 fokos torziószögváltozás is jellegzetes spektrális eltérést okozhat [13, 15]. A mérés időskálája következtében (gyors módszer) elvben bármely összetett CD-spektrum görbefulatás segítségével az egyes konformerekre jellemző, tiszta komponensspektrumokra bontható fel. Alapvető nehézséget jelent egyrészt az,

hogy az analizált térszerkezetű típus szekvenciális hozzárendelése egyáltalán nem oldható meg a módszer keretein belül (globális módszer), másrészt hogy a spektrumok önmagukban nem értelmezhetők (relatív vagy más szóval modellfüggő módszer). Mivel a mozgékony molekulák keverékspektrumai görbefulbontás nélkül csak nehezen értelmezhetőek, az elmúlt évtizedek során alapvető célkitűzés volt a rögzített modellvegyületek szintézise és térszerkezet-vizsgálata. Az így kapott modellvegyületek CD-spektruma alapul szolgált a hozzárendelési problémák megoldásában is.

A történetileg elsőként alkalmazott infravörös (IR) spektroszkópia segítségével a molekulák rezgési analízise eredményesen elvégezhető, akár oldat, akár szilárd fázisban. A peptidkonformáció területén a ma használt Fourier-transzformációs (FT-IR) spektrofotométerek segítségével az amidok rezgési sajátosságai analizálhatók. A gyakorlatban leginkább használt amidkarbonil ($>C=O$) nyújtási frekvencia tartománya (amid I sáv), valamint az amid NH frekvenciaanalízise, a rendszerben található intra- vagy intermolekuláris hidrogénhidak közvetlen vizsgálatát teszik lehetővé. A mérési időskála rövid, ezért a konformerek individuális analízise is elvégezhető, ám a CD-spektroszkópiához hasonlóan a közvetlen hozzárendelés nem lehetséges. Így például az esetenként azonosított H-hidak a molekulán belül csak nehezen, vagy egyáltalán nem lokalizálhatók.

Az NMR-spektroszkópia térhódítása szembeötlő az oldatfázisú térszerkezet-analízis területén, s hála az utolsó tíz évben végzett forradalmi jellegű hardware és software fejlesztéseknek, az 1D- és 2D-NMR kísérletek rutinszerűen alkalmazott eljárásokká [16, 17] váltak. A háromdimenziós szerkezetvizsgálat területén a korábban alkalmazott eljárások (kémiai eltolódások és csatolási állandók mérése, hőmérséklet- vagy oldószerfüggés vizsgálata stb.) mellett a NOE, NOESY, ROESY, valamint a fázisérzékeny COSY módszerek is széles körben elterjedtek. Segítségükkel esetenként $\pm 0,1 \text{ \AA}$ pontosságú geometriai információk gyűjthetők a molekula térszerkezetéről [16, 17]. Peptid konformerkeverékek analízise során azonban metodikai problémák is felmerülnek, mivel a mérés időskálája következtében az egyedi konformerek spektrális tulajdonságai általában kiátlagolódnak és a vizsgált modellek dinamikus viselkedéséből fakadóan a konformerarányok pusztán NMR alapon már di- és tripeptidek esetében sem határozhatóak meg.

Önmagában tehát egyetlen oldatfázisban alkalmazott spektroszkópiai módszer sem nyújt lehetőséget konformerkeverékek esetében a térszerkezetek teljes körű meghatározására. Óhatatlanul támaszkodni kell tehát olyan térszerkezeti információkra is, amelyek szigorú értelemben csak szilárd fázisra vagy intermolekuláris kölcsönhatásoktól mentes környezetre (vákuumra) vonatkoznak. Az abszolút módszerként számon tartott röntgenkrisztallográfia segítségével meghatározott térkoordináták, valamint a mikrohullámú és ESR-spektroszkópiai mérések eredményeként kapott korlátozott hatáskörű térszerkezeti információk mellett, napjainkra a számításokon alapuló szerkezetek jelentősége is megnőtt. A peptidok témakörében korábban egyeduralgó egyszerűbb force-field (vagy molekuláris mechanikai [MM] eljárások mint az ECEPP [18]) és molekuláris dinamikai [MD] módszerek (Charmm [19]), valamint félempirikus (CNDO, MNDO, MINDO) [20] eljárások mellett ma már ab initio (SCF-HF) szintű számítások is lehetővé váltak.

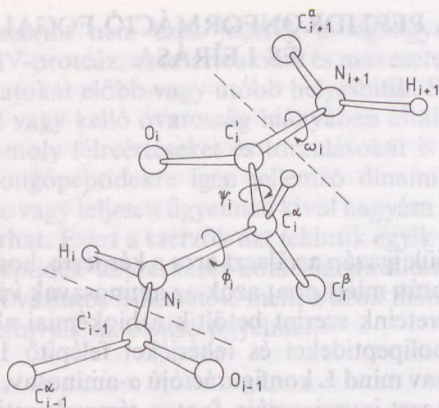
PERUTZ ÉS KENDREW első röntgenkrisztallográfiai mérései óta, az elmúlt 40 év leforgása alatt a mérési módszerek hatalmas fejlődésen mentek keresztül. A spektrométerek dinamikus fejlesztése és az adatfeldolgozás minőségi megváltozása, valamint új eljárások kifejlesztése napjainkra a térszerkezet-vizsgálati módszerek egész arzenálját sorakoztatta fel. Ma már közel ezer fehérje és peptid szilárd fázisú szerkezete ismert, és a tématerület rohamos fejlődésének bizonyítéka, hogy napjainkban évente több ezer publikáció jelenik meg e témakörben. A fokozott érdeklődés indokolt, hiszen a modern kémia, biokémia és biológia egyik fő feladata a „szerkezet—hatás” összefüggések mélyebb megértése. E folyamatban a térszerkezet megismerése elengedhetetlen láncszem. Gyakran a szerzők a szerkezetvizsgálat által leszűkített térszerkezetcsalád vagy egyedi téralkat konformációs paramétereit valamilyen egyszerűsített ábra formájában teszik szemléletessé. Míg azonban az eredeti közlemények általában tartalmazzák a „varázslatos képek-re” vonatkozó megszorításokat és bizonytalanságokat, addig a térszerkezeti ábrázolások bővületében az olvasók gyakran megfedelkeznek az adatokat szolgáltató spektroszkópiai módszerek hiányosságairól és korlátaikról. Végül számos esetben a kezdetben közelítő jellegűnek szánt szemléltető ábra a térszerkezet abszolút visszatükröződéseként jelenik meg. Hibás NMR hozzárendelések és téves kristallográfiai adatok is tarkítják a szakirodalmat, ám

megítélésünk szerint nem ezek jelentik a legnagyobb veszélyt. Amint azt a HIV-proteáz, az interleukin-2 és más esetek is bizonyítják, a téves adatokat előbb vagy utóbb helyesbítik. Sajnos a kritikátlanul átvett vagy kellő óvatosság hiányában általánosított térszerkezetek komoly félreértéseket és torzulásokat is okozhatnak. Ugyanígy az oligopeptidekre igen jellemző dinamikus karakter leegyszerűsítése vagy teljesen figyelmen kívül hagyása súlyos következménnyel járhat. Ezért a szerzők azt tekintik egyik célkitűzésüknek, hogy a peptidek térszerkezet-kutatásában általánosan használt módszerek vázlatos ismertetése mellett azok hiányosságaira és korlátaira is felhívják az olvasó figyelmét.

1. A PEPTIDKONFORMÁCIÓ FOGALMA ÉS LEÍRÁSA

Nem ismerjük igazán a választ arra a kérdésre, hogy a molekuláris evolúció során miért pont azok az aminosavak választódtak ki, amelyek ismereteink szerint betöltik a biokémiai alapépítőkövek szerepét. A polipeptideket és fehérjéket felépítő 19 természetes királis aminosav mind L konfigurációjú α -aminosav, amelyek királisitás- és szerkezet-invarianciája fontos térszerkezeti következményekkel jár (1.1. ábra). A C^α szubsztituensek körüljárási iránya minden természetes királis aminosav esetében ugyanaz. A királis szénatomra vonatkozó Cahn—Ingold—Prelog önkényes definíció értelmében ugyan a cisztein R, míg a többi 18 természetes királis aminosav S abszolút konfigurációjú, azonban kiroptikai szempontból mindegyik hasonló módon perturbálja a peptidláncban a környező csoportokat. (Emlékeztetőül megjegyezzük, hogy a Cahn—Ingold—Prelog körüljárási szabály alapját a királis centrumot körülvevő atomok tömegszámának sorrendje képezi, s csupán ennek következménye, hogy a kénatomot is tartalmazó cisztein abszolút konfigurációja eltér a többi királis aminosav abszolút konfigurációjától.) Egyetlen kivételt az oldallánc nélküli glicin jelenti, amely aminosav C^α atomjához két hidrogénatom kapcsolódik és ezért akirális (1.1. táblázat). A természetes aminosavak oldalláncai kémiaiilag igen változatos funkcióscsoportokat hordoznak, ám két kivételtől eltekintve (Ile, Thr) mind a 17 alkil- és aralkilcsoport akirális. (Az Ile béta szénén [C^β] S, míg a Thr oldalláncán található kiralitáscentrumnak R az abszolút konfigurációja.) A pirrolidinyűrűt tartalmazó prolin és az oldallánc nélküli glicin kivételével mind a 18 α -aminosav oldalláncának funkcióscsoportjait legálább egy szénatom (metin- vagy metiléncsoport) választja el a királis α szénatomtól. Így az oldalláncban elhelyezkedő funkcióscsoportok elkülönülnek a peptidgerinc atomjaitól mind szerikusan, mind elektronikus szempontból.

A peptidek és fehérjék hidrolízise vagy kimerítő enzimatis lebontása során az amidkötések elhasadása aminosavakat eredmé-



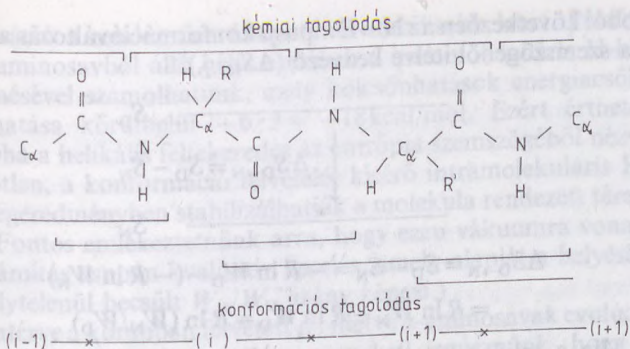
1.1. ábra. A fehérjék és peptidok szerkezeti elve. Az ábra a Z (transz) diamidrészetlet és a térkémi leírására szolgáló φ , ψ és ω torziósögeket mutatja be. A fehérjéket felépítő α -aminosavak homokirálisak

1.1. táblázat

A 20 természetes aminosav neve, egy-, valamint hárombetűs kódja, illetve az α -szén-atomhoz kapcsolódó oldalláncok kémiai összetétele

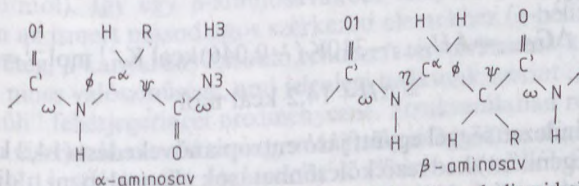
Aminosav típusa	Kódja		Oldalláncok
glicin	G	Gly	—H
alanin	A	Ala	—CH ₂ —H
valin	V	Val	—CH—(CH ₃) ₂
leucin	L	Leu	—CH ₂ —CH(CH ₃) ₂
izoleucin	I	Ile	—CH—(CH ₃)(C ₂ H ₅)
szerin	S	Ser	—CH ₂ —OH
treonin	T	Thr	—CH—(CH ₃)OH
cisztein	C	Cys	—CH ₂ —SH
metionin	M	Met	—CH ₂ —CH ₂ SCH ₃
fenilalanin	F	Phe	—CH ₂ —C ₆ H ₅
tirozin	Y	Tyr	—CH ₂ —C ₆ H ₅ —OH
triptofán	W	Trp	—CH ₂ —C ₈ H ₆ N
aszparaginsav	D	Asp	—CH ₂ —COOH
aszparagin	N	Asn	—CH ₂ —CONH ₂
glutaminsav	E	Glu	—CH ₂ —CH ₂ COOH
glutamin	Q	Gln	—CH ₂ —CH ₂ CONH ₂
lizin	K	Lys	—CH ₂ —C ₃ H ₆ NH ₂
arginin	R	Arg	—CH ₂ —C ₂ H ₄ NHC(NH ₂)
hisztidin	H	His	—CH ₂ —C ₃ H ₃ N ₂
prolin	P	Pro	—C ₃ H ₆ *

* A prolin pirolidingyűrűjét alkotó metilénsoportok.



1.2. ábra. Peptideket felépítő konstitúciós és konformációs alegységek

nyez, amelyeket konstitúciós értelemben szerkezeti alapköveknek tekinthetünk. Ugyanakkor konformációs szempontból az aminosavak teljesen eltérő viselkedést mutatnak a belőlük felépülő polimerektől (1.2. ábra). Ezért a konformációs viszonyok megértését célzó analízis során nem az aminosavakat, hanem azok amidszármazékait szokták vizsgálni. Mivel β -aminosavat mostanáig fehérjékből nem izoláltak, úgy tűnik, hogy az összes természetes aminosav homokirális és α -aminosav konstitúciójú (1.3. ábra). A β -aminosavak az abiogén evolúció során a racém α -aminosavakkal együtt keletkeztek, amint ezt az ősatmoszféra kémiai modellezése [21, 22] egyértelműen igazolta. Éppen ezért nehéz csupán kémiai szempontok figyelembevételével indoklást találni az evolúció során lezajlott teljes körű szelekcióra. Már igen egyszerű termodinamikai és statisztikus megfontolások is adhatnak azonban némi magyarázatot a β -aminosavakból felépülő polipeptidek kedvezőtlen konformációs viszonyaira. Fehérjék natív (N) térszerkezeteiben a rendezettség nagyobb, mint ugyanazon molekula denaturált (D) állapotában, ezért az entrópia vagy rendezetlenség kisebb ($S_N < S_D$).



1.3. ábra. Egy α - és egy β -aminosavrészekből felépülő polimerek diamid alegységei

Ebből következően az N→D típusú konformációváltozás az entrópia szempontjából ítéelve kedvező ($\Delta S_{N \rightarrow D}$).

$$\begin{array}{c} \text{-----} S_D \\ \downarrow \Delta S_{D \rightarrow N} = S_D - S_N \\ \text{-----} S_N \end{array}$$

$$\begin{aligned} \Delta S_{D \rightarrow N} &= S_D - S_N = -R \ln W_D - (-R \ln W_N) = \\ &= R \ln W_N - R \ln W_D = R \ln (W_N/W_D) \end{aligned} \quad (1.1)$$

Míg a teljesen rendezetlen konformáció esetében (D állapot, amely valószínűsége W_D) a ϕ , ψ párok a Ramachandran-felszín tetszőleges szerinti megengedett pontjain helyezkednek el, addig egy adott rendezett konformáció (például az α -hélix) felvétele szigorúan megszorított ϕ , ψ értékpárokat jelent [$\phi^\alpha \approx -54^\circ$, $\psi^\alpha \approx -45^\circ$]. Természetesen a két állapot valószínűségének arányát nehéz megbecsülni (W_N/W_D), ám legyen az egyszerűség kedvéért például a Ramachandran-felszín hélix része a teljes megengedett tartomány 10%-a. Így egy 10 aminosavból álló „tökéletes” hélix kialakulása során a becsülhető entrópiaváltozás:

$$\begin{aligned} \Delta S_{D \rightarrow \alpha} &= R \ln (W_\alpha/W_D) = 1,98 \cdot 10^{-3} \cdot 10 \ln(0,1) = \\ &= -0,046 \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}. \end{aligned} \quad (1.2)$$

A polipeptidlánc szabadenergiája natív (G_N), illetve rendezetlen esetben (G_D) eltérő, mely értelemszerűen a két állapotra jellemző szabadentalpiák különbözőségét is jelenti (H_N , H_D).

$$\Delta G_{D \rightarrow \alpha} = \Delta H_{D \rightarrow \alpha} - T \Delta S_{D \rightarrow \alpha} \quad (1.3)$$

Ezért testhőmérsékleten (37 °C [310 K]) a hélixképződés miatt megnövekedett rendezettség energiajáruléka a fent említett deka-peptidre:

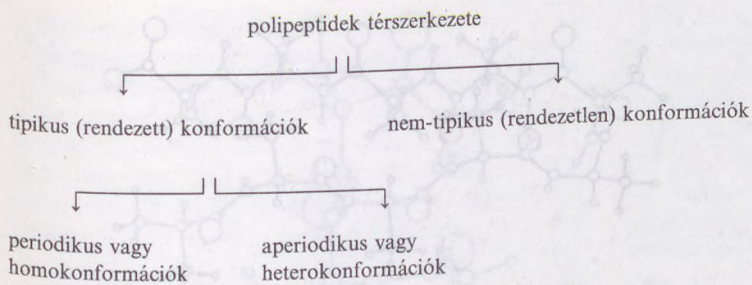
$$\begin{aligned} \Delta G_{D \rightarrow \alpha} &= \Delta H_{D \rightarrow \alpha} - 310 \text{K} (-0,046) \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} = \\ &= \Delta H + 14,2 \text{ kcal mol}^{-1}. \end{aligned} \quad (1.4)$$

Ha a rendezettséggel együtt járó entrópiánövekedést (14,2 kcal/mol alegységenként) kedvező kölcsönhatások ellensúlyozni tudják (például intramolekuláris hidrogénkötések stb.), akkor a rendezett

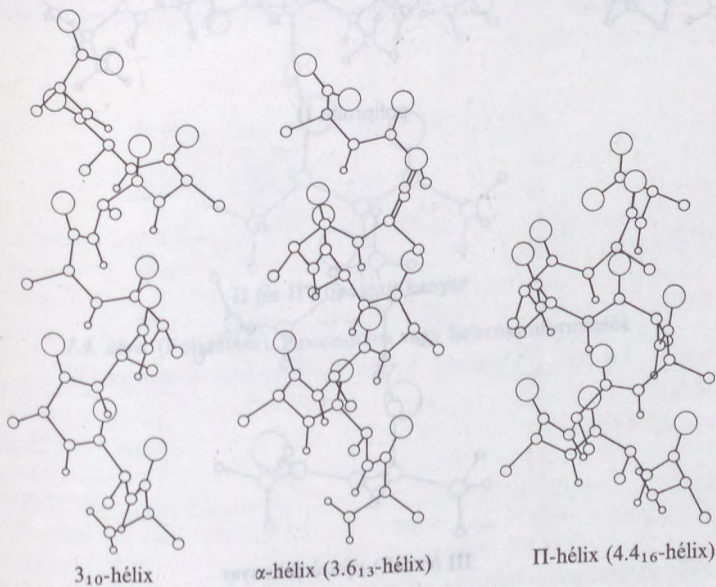
konformáció a rendezetlen állapotánál stabilisabb lehet. Például egy tíz aminosavból álló hélix esetében 6 intramolekuláris H-híd megjelenésével számolhatunk, mely kölcsönhatások energiacsökkentő hatása körülbelül $-6 \cdot 3 = -18 \text{ kcal/mol}$. Ezért érthető, hogy noha a helikális feltekeredés az entrópia szemszögéből nézve kedvezőtlen, a konformáció felvételét kísérő intramolekuláris H-hidak végeredményben stabilizálhatják a molekula rendezett téralakatát. (Fontos emlékeztetnünk arra, hogy ezen alapját a helyesen vagy helytelenül becsült W_N/W_D arány képezi.)

Visszatérve a korábban felvetett β - illetve α -aminosavak evolúciós szelekciójának problémájához, meg kell jegyeznünk, hogy a β -aminosavak esetében a gerinckonformáció leírásához az α -aminosavaktól eltérően nem két, hanem három független változó megadása szükséges (1.3. ábra). Ez feltétlenül a W_α/W_D arány romlását jelentené, minek következtében a rendeződéssel járó „kedvezőtlen” entrópiaváltozás tetemesen megnőne [lásd (1.2) egyenlet]. A polipeptidláncban megjelenő β -szén szabadságfok növekedéssel jár, mivel itt már egy 3D-Ramachandran-térrel van dolgunk, amelyet a $[\phi, \psi$ és $\eta]$ konformációs paraméterek határoznak meg. A W_α/W_D arány lecsökken, és ezért értékét 10% helyett 1%-nak becsülhetjük például. Ezért A 10 alegységre számolt $\Delta S_{D \rightarrow \alpha}$ így körülbelül $-0,137 \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, amely végeredményben 42,5 kcal/mol túlkompenzálandó szabadenergia növekedést ($\Delta G_{D \rightarrow \alpha}$) jelent. Ha az α -aminosavakból felépülő jobbmenetű hélix analógiája alapján képzeljük el a β -aminosavakból felépülő 10 elemű hélixet, akkor ez esetben is csak 6 intramolekuláris hidrogénhidat feltételezünk. Így talán jobban érthető, hogy a β -aminosavakból felépülő polipeptidlánc feltekeredésének nincs termodinamikai hajtóereje, mivel a feltételezett konformációváltozás szabadenergia növekedése ($\Delta G_{D \rightarrow \alpha} = 42,5 \text{ kcal/mol}$) jelentősen meghaladja a folyamatot kísérő hidrogénhidak stabilizáló hatását (18 kcal/mol). Így egy β -aminosavakból felépülő polipeptidlánc esetében az ismert másodlagos szerkezeti elemekhez (α -hélix, β -redőzött réteg, β -kanyarok) hasonló rendezett térszerkezetek kialakulásának nincs valószínűsége, ami jelenlegi tudásunk szerint „szerkezet-nélküli” fehérjegerincet eredményezne. Strukturálatlan rendszer esetében viszont enzimatikus vagy más funkció betöltése aligha képzelhető el, s talán ezért oly csekély a β -aminosavakból felépülő polipeptidek evolúciós fejlődésének és túlélésének hajtóereje.

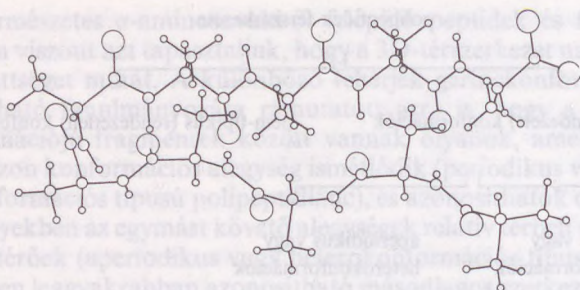
A természetes α -aminosavakból felépülő peptidek és fehérjék esetében viszont azt tapasztaljuk, hogy a 3D-térszerkezet nagyfokú rendezettséget mutat. A különböző fehérjék gerinckonformációinak beható tanulmányozása rámutatott arra is, hogy a tipikus konformációjú fragmensek között vannak olyanok, amelyekben ugyanazon konformációs alegység ismétlődik (periodikus vagy homokonformációs típusú polipeptidlánc), és azonosíthatók olyanok is, amelyekben az egymást követő alegységek relatív térbeli orientációja eltérők (aperiodikus vagy heterokonformációs típus). A fehérjékben leggyakrabban azonosítható másodlagos szerkezetek, az α -hélix $[(\phi_i \approx -45^\circ \pm 15^\circ, \psi_i \approx -45^\circ \pm 15^\circ)_n]$, β -redőzött réteg $[(\phi_i \approx -150^\circ \pm 15^\circ, \psi_i \approx 150^\circ \pm 15^\circ)_n]$, valamint a poli(prolin) II, $[(\phi_i \approx -60^\circ \pm 15^\circ, \psi_i 120^\circ \pm 15^\circ)_n]$ konformációk a homokonformáció kategóriába tartoznak. A fehérjék felszínén gyakran azonosítható úgynevezett β -kanyarokban a gerinckonformációt leíró torziószög-párok alegységenként más és más értékeket vesznek fel. Például az I típusú β -kanyarban a második ($i+1$) és a harmadik ($i+2$) alfa szénatom körül a ϕ, ψ párok értékei különbözőek; $\phi_{i+1}^1 = -60^\circ \pm 30^\circ, \psi_{i+1}^1 = -30^\circ \pm 30^\circ, \phi_{i+2}^1 = -90^\circ \pm 30^\circ, \psi_{i+2}^1 = 0^\circ \pm 30^\circ$ (1.4. ábra). Az irodalomból jól ismert tipikus konformációjú alegységek elhelyezkedését a Ramachandran-felszínen az 1.5. ábra mutatja be. Globuláris fehérjék röntgenkrisztallográfiai adatainak tükrében, a tipikus konformációjú alegységek (α -hélix, β -redőzött réteg, β -kanyarok) a fehérje teljes térszerkezetének általában 65–85%-át képezik. A fennmaradó hányadot „nem-tipikus” vagy rendezetlen (random) konformációnak szokás hívni. Ez az elnevezés mai ismereteink szerint pontatlan és félrevezető, mivel a „nemkategorizált” hányadról nincs jogunk feltételezni, hogy esetlegesen sokféle térszerkezetet vehetne fel. Fehérjék krisztallográfiai úton meghatározott szerkezeteit tároló adatbankokból [23, 24] kiválasztott 78 fehérje főláncának ϕ, ψ torziószögértékei alapján nyilvánvaló (1.5. ábra), hogy a szilárd fázisban megfigyelt konformációk egy része hasonlóságot mutat, másik hányada viszont szignifikáns módon eltér a tipikus konformációnak nevezett szerkezeti építőkövek téralkataitól (hasonlítsuk össze az 1.5-ös és az 1.6-os ábrákat). Vagyis a röntgenkrisztallográfiai úton meghatározott konformációs adatpárok ($[\phi, \psi]$ szögértékek) egy hányada a Ramachandran-felszín azon tartományában található, amelyekhez „referencia” szerkezetek egyáltalában nem rendelhetők (1.6. ábra). Felvetődött ezért a kérdés, vajon a fehérjék véges számú vagy esetlegesen sokféle szerkezeti elemből épülnek-e fel?



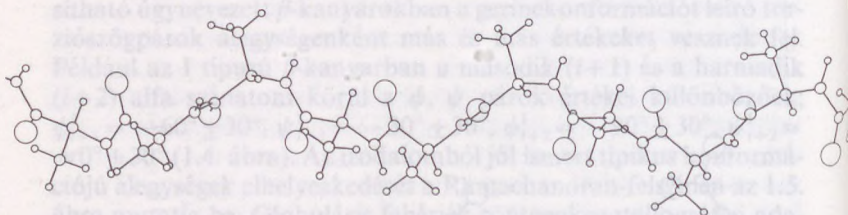
1.4. ábra. A fehérjék másodlagos szerkezeteinek csoportosítása



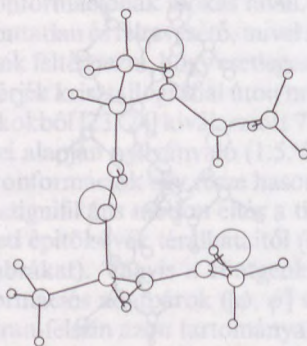
1.4. ábra. (Folytatása). Periodikus vagy homokonformációk



β -redőzött réteg

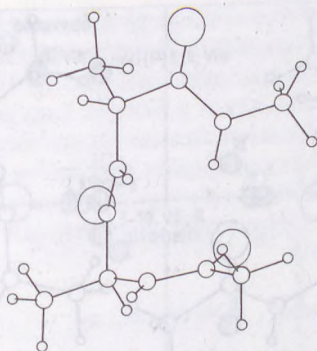


poliprolin II

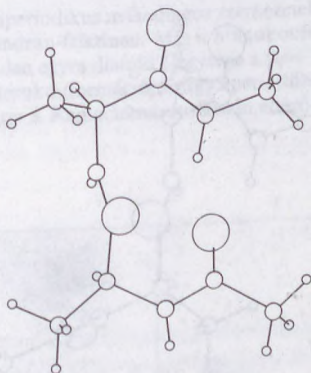


III (és III') típusú β -kanyar

1.4. ábra. (Folytatása). Periodikus vagy homokonformációk

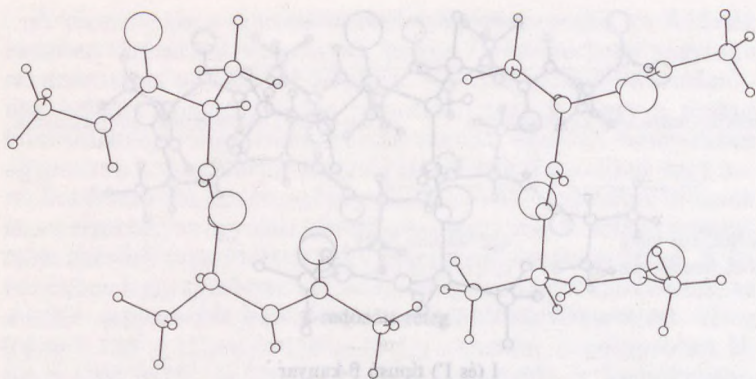


I (és I') típusú β -kanyar

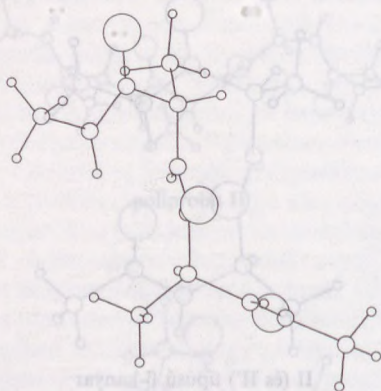


II (és II') típusú β -kanyar

1.4. ábra. (Folytatása). Aperiodikus vagy heterokonformációk

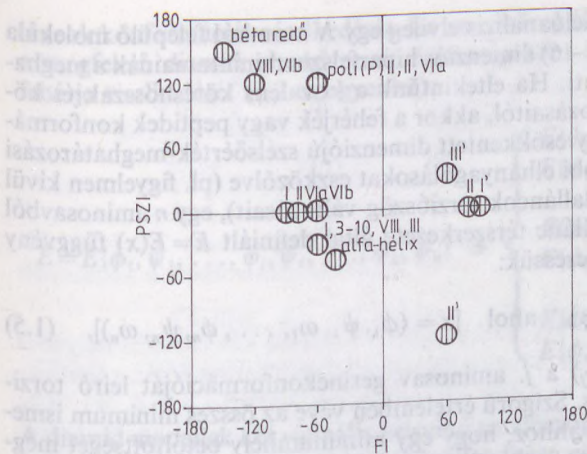


Vla (és VIb) típusú β -kanyar

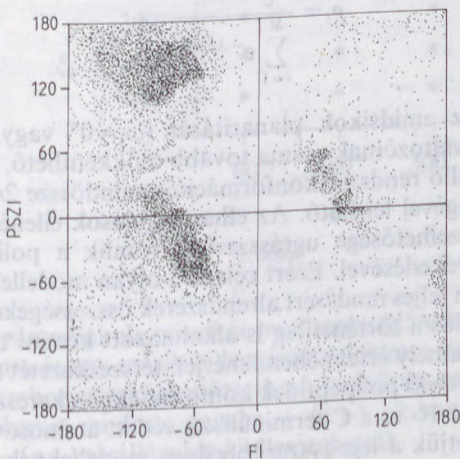


VIII típusú β -kanyar

1.4. ábra. (Folytatása). Aperiodikus vagy heterokonformációk



1.5. ábra. Periodikus és aperiodikus másodlagos szerkezetek konformációs alegységeinek helye a Ramachandran-felszínen. Míg a homokonformációjú vagy periodikus β -redőzött réteg minden egyes diamid alegysége a $\{\varphi = -150^\circ, \psi = 150^\circ\}$ tartományba esik, addig a heterokonformációjú vagy aperiodikus I típusú β -turn első és második torziósögpárja a Ramachandran-felszín eltérő helyein azonosítható



1.6. ábra. 78 fehérje φ, ψ értékeinek eloszlása a röntgenkristallográfiai mérések alapján

A konformációanalízis elvileg egy N atomból felépülő molekula esetében a $(3N - 6)$ dimenziós hiperszféra minimumainak a meghatározását jelenti. Ha eltekintünk a kovalens kötéshosszak és kötésszögek változásaitól, akkor a fehérjék vagy peptidok konformációanalízise egy csökkentett dimenziójú szélsőérték-meghatározási feladat. További elhanyagolásokat eszközölve (pl. figyelmen kívül hagyjuk az oldalláncok torziószög-változásait), egy n aminosavból álló polipeptidlánc térszerkezete által definiált $E = E(x)$ függvény minimumait keressük:

$$E = E(x), \text{ ahol } [x = (\phi_1, \psi_1, \omega_1, \dots, \phi_n, \psi_n, \omega_n)], \quad (1.5)$$

ahol $(\phi_j, \psi_j, \omega_j)$ a j . aminosav gerinckonformációját leíró torziószög-hármas. Szigorú értelemben véve az összes minimum ismerete szükséges ahhoz, hogy egy minimumhely betöltöttségét megadhassuk, azaz meghatározhassuk az i . konformációhoz tartozó valószínűségi értéket (p_i). Ha az i -dik konformer ($1 \leq i \leq M$) energiaeltérése (ΔE_i) a globális minimumhelyhez tartozó teljes energiától ismert, akkor ezen állapot előfordulási valószínűségét (a konformer populációját) a következő módon adhatjuk meg a Boltzman-eloszlás értelmében:

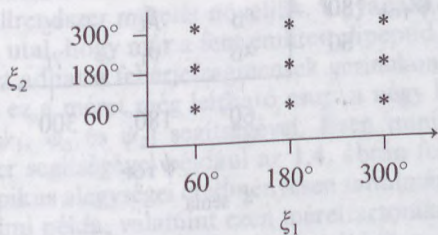
$$p_i = \frac{e^{-\Delta E_i/RT}}{\sum_{i=1}^M e^{-\Delta E_i/RT}}. \quad (1.6)$$

Feltételezve az amidsíkok planaritását ($\omega_i = 0^\circ$ vagy 180°), az (1.5) egyenlet változóinak száma tovább csökkenthető, s így egy n aminosavból álló rendszer konformációja mindössze $2n$ független változó segítségével leírható. Az elhanyagolások ellenére az ilyen problémák kezelhetősége ugrásszerűen romlik a polipeptidlánc hosszának növekedésével. Ezért célszerű olyan modellek kiválasztása, amelyek a teljes rendszert alrendszerek összességként írják le. Ez az elgondolás a történetileg is alkalmazott kémiai modellezésnek felel meg, amely értelmében fehérjék térszerkezetét fragmensek, azaz a megfelelő polipeptidek konformációján keresztül óhajtja megismerni. Az N- és C-terminálison védett aminosavszármazékokat tekinthetjük a legegyszerűbb ilyen modelleknek. A diamid rendszerek méretüknél fogva könnyen kezelhetők, és ezért történetileg elsőként ezek segítségével modellezték a hosszabb polipeptid-

láncok konformációs viselkedését. Ez az „elsőrendű közelítésmód” a megfelelő diamid alrendszerek összességéként írja le az adott fehérje viselkedését (1.7-es egyenlet).

$$E = E\{\phi_1, \psi_1, \dots, \phi_i, \psi_i, \dots, \phi_n, \psi_n\} \Rightarrow \begin{cases} E\{\phi_1, \psi_1\} \\ E\{\phi_2, \psi_2\} \\ \vdots \\ E\{\phi_{i-1}, \psi_{i-1}\} \\ E\{\phi_i, \psi_i\} \\ \vdots \\ E\{\phi_{n-1}, \psi_{n-1}\} \\ E\{\phi_n, \psi_n\} \end{cases} \quad (1.7)$$

A diamid modellek két vicinális helyzetű torziószöget $\{\phi, \psi\}$ tartalmaznak, amelyek mindegyikének körülfordítása esetén három minimum energiájú konformer megjelenése várható. Ez a kvalitatív kép analóg a propán konformációanalízisével, ahol a két C—C kötés mentén történő elfordulás mértékét a ξ_1 és a ξ_2 torziószögek mérik, amely független változók által definiált $f(\xi_1, \xi_2)$ felszínen a várható minimumok száma 9 (2. séma „*” jelölt pontjai).



2. séma

Ha a propánmolekula mindkét metilcsoportjának egy hidrogénjét deutériumra és egy másik hidrogénjét tríciumra cseréljük, akkor a 9 minimumhoz megkülönböztethető molekulaszervezetek tartoznak, amelyeket rendre a gauche + ($g+$), az anti (a), valamint a gauche - ($g-$) térállásokkal jellemezhetjük.

ξ_2	300°	$g+, g-$	$a, g-$	$g+, g-$
	180°	$g+, a$	a, a	$g+, a$
	60°	$g+, g+$	$a, g+$	$g+, g+$
		60°	180°	300°
		ξ_1		

3. séma

Mivel a dipeptidrendszerek esetében szintén két vicinális helyzetű torziószög határozza meg a peptidgerinc konformációját, a fentiekkel analóg módon kilenc minimumhely várható a $f(\phi, \psi)$ vagy közismert nevén Ramachandran-felületen. Itt is alkalmazhatnánk a *gauche +*, *anti*, valamint *gauche -* jelölést, ám a tapasztalat értelmében a minimumhelyek eltolódása esetenként olyan mértékű lehet, hogy célszerű a minimumok egyedi elnevezése: $\alpha_L, \alpha_D, \beta_L, \gamma_L, \gamma_D, \delta_L, \delta_D, \varepsilon_L, \varepsilon_D$. A 4. séma ezek idealizált elhelyezkedését mutatja.

ψ_{TOP}	300°	γ_D	δ_D	α_L
	180°	ε_D	β_L	ε_L
	60°	α_D	δ_L	γ_L
		60°	180°	300°
		ψ_{TOP}		

4. séma

Később részletesen bemutatjuk (lásd 6. fejezet), hogy taszítási vagy vonzási kölcsönhatások következtében bizonyos kritikus pontok összeolvadhatnak, illetve más minimumok helyei jelentősen módosulhatnak az aminosav oldalláncának, illetve a környező aminosavak függvényében. Ezért a 9 gerinckonformer ($\alpha_L, \alpha_D, \beta_L, \gamma_L, \gamma_D, \delta_L, \delta_D, \varepsilon_L, \varepsilon_D$) torziószög értékeinek egyetemes megadása nem lehetséges.

Polipeptidek vagy fehérjefragmensek modellezése során a legnagyobb tudományos kihívást az optimális peptidméret és a szekven-

cia megválasztása jelenti. A tapasztalatok értelmében a fehérjékben fellépő karakterisztikus gerinckonformáció típusok már két egymással összekapcsolt aminosavegység (triamid rendszer) segítségével sikeresen modellezhetők (lásd 6. fejezet). Az N- és a C-terminálison védett dipeptidok segítségével például nemcsak a β -redőzött réteg, hanem a β -kanyar térszerkezetek (vagy más periodikus konformerek) tipikus konformációs eleme is vizsgálható. Ez a „dipeptid-közelítés”, amely során csupán 4 független változó segítségével definiáljuk a konformációs alteret.

$$E = E\{\phi_1, \psi_1, \dots, \phi_i, \psi_i, \dots, \phi_n, \psi_n\} \Rightarrow \begin{cases} E\{\phi_1, \psi_1, \phi_2, \psi_2\} \\ E\{\phi_2, \psi_2, \phi_3, \psi_3\} \\ \vdots \\ E\{\phi_{i-1}, \psi_{i-1}, \phi_i, \psi_i\} \\ E\{\phi_i, \psi_i, \phi_{i+1}, \psi_{i+1}\} \\ \vdots \\ E\{\phi_{n-2}, \psi_{n-2}, \phi_{n-1}, \psi_{n-1}\} \\ E\{\phi_{n-1}, \psi_{n-1}, \phi_n, \psi_n\} \end{cases} \quad (1.8)$$

Természetesen a használt közelítésmód pontossága nő, ha a vizsgált modellrendszer méretét növeljük. Ugyanakkor számos tapasztalat arra utal, hogy már a fent említett dipeptid közelítésmód is hiteles képet adhat a fehérjefragmensek gerinckonformációs viszonyairól, és ez a méret még leírható csupán négy konformációs változó $[\phi_1, \psi_1, \phi_2, \psi_2]$ segítségével. Ezen minimális méretű modellrendszer segítségével például az 1.4. ábrán feltüntetett térszerkezetek tipikus alegségei eredményesen tanulmányozhatók. A sokrétű irodalmi példa, valamint ezen mérettartomány kitüntetett jelentősége miatt különös figyelmet szenteltünk a dipeptidekkel (triamid rendszerekkel) kapcsolatos elméleti, valamint gyakorlati spektroszkópiai adatok ismertetésének.

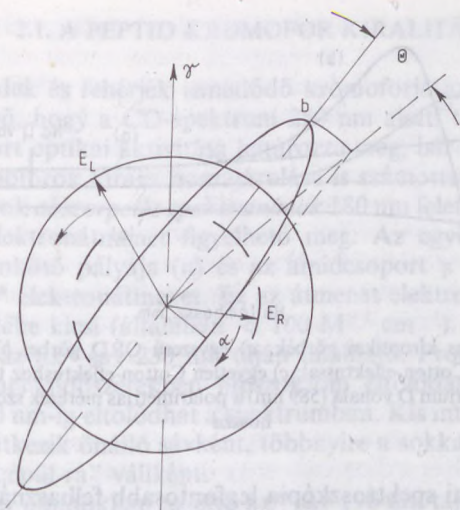
2. POLIPEPTIDEK CIRKULÁRIS DIKROIZMUS SPEKTROSKÓPIAI VIZSGÁLATA

A kiroptikai módszerek két legismertebb válfaja a cirkuláris dikroizmus (CD) és az optikai rotációs diszperzió (ORD) spektroszkópia. A *kiroptika* kifejezés arra utal, hogy az anyag és a cirkulárisan polarizált fény két formája, a jobbra és balra cirkulárisan polarizált fény közötti kölcsönhatás különbözik egymástól. Az optikailag aktív közegben a lineárisan polarizált fény két komponense különböző sebességgel terjed (vagyis különböző a törésmutatója, $n_j \neq n_b$), illetve különböző mértékben abszorbeálódik. A két jelenség abban nyilvánul meg, hogy a közegből kilépő fény polarizációs síkja elfordul a belépőéhez képest — ez az optikai forgatás — és áthaladás közben *elliptikusan polarizálttá* válik (2.1. ábra). Mindkét jelenség függ a fény hullámhosszától. Az optikai forgatás diszperziója az ORD, az ellipticitás hullámhosszfüggése pedig a CD.

Az optikai aktivitás jelenséget PASTEUR már 1848-ban a molekulák szerkezetének disszimmetriájára vezette vissza. A tetraéderelmélet (VAN'T HOFF és LE BEL, 1874) alapján minden addig ismert optikailag aktív vegyületre disszimmetrikus — mai szóhasználattal királis — térszerkezet volt levezethető. Bár a jelenség fizikai alapjait nem ismerték, a kiralitás és az optikai aktivitás közötti fenomenológikus kapcsolat kezdettől fogva nagy szerepet játszott a molekulák térszerkezeti viszonyainak megismerésében és ezen keresztül a sztereo-kémia kialakulásában.

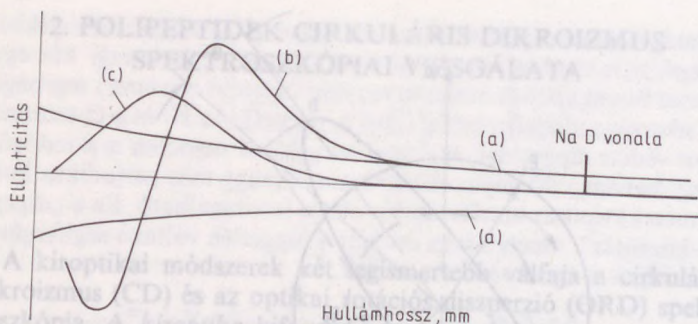
Az optikai aktivitás klasszikus elektrodinamikán nyugvó elméletét már a múlt század végén kidolgozták (DRUDE, 1892), a kvantummechanikai értelmezés alapjait ROSENFELD rakta le 1928-ban. A kiroptikai spektroszkópia elméletét részletesen tárgyalja KAJTÁR MÁRTON, SURJÁN PÉTER és ÁNGYÁN JÁNOS kiváló munkája [25], így ezek ismertetésétől eltekintünk.

A kiroptika hosszú időn keresztül a forgatóképesség egyetlen (nátrium D-vonala, 589 nm), illetve néhány diszkrét hullámhosszon (pl. a higanygőzlámpa vonalain) történő mérésére korlátozó-



2.1. ábra. Elliptikusan polarizált fény. Θ , az ellipticitás szöge ($\text{tg}\Theta = a/b$); γ , a beeső fény polarizációs síkja; α , a forgatás szöge = az ellipszis főtengelye és a γ által bezárt szög

dott. Az első fotoelektromos spektropolarimétert RUDOLPH építette meg 1955-ben, CD-spektrométerek — *dikrográfok* — a 60-as évek elején kerültek kereskedelmi forgalomba [26]. A 70-es évek közepétől a dikrográfok fokozatosan kiszorították az ORD-készülékeket. Ennek számos elméleti és gyakorlati oka van. A CD-sáv viszonylag szűk (kis sáv szélességű) Gauss-görbével közelíthető, szemben az ORD-spektrum lényegesen szélesebb Cotton-effektusaival (2.2. ábra), amelyek csak lassan, az abszorpciós maximum helyétől (λ_0) távol, a $(\lambda^2 - \lambda_0^2)^{-2}$ függvényében közelítenek a nullához. A CD-görbék matematikai szempontból lényegesen könnyebben kezelhetők. Kis sáv szélességük gyakorlati szempontból azzal az előnnyel jár, hogy a királis molekula *kromofor* csoportjainak különböző elektronátmeneteihez tartozó CD-sávok viszonylag jól elkülönülnek egymástól, és így külön-külön tanulmányozhatók, szemben az ORD-spektrummal, ahol a közeli ultraibolya és látható tartományban jelentkező elektronátmenetek hozzájárulása rendszerint a távoli ultraibolya tartományban található erős Cotton-effektusok „leszálló ágára” superponálódik, és így kísérletileg csak nehezen vizsgálható.



2.2. ábra. Tipikus kiroptikai görbék. a) egyszerű ORD görbe; b) ORD görbe egyetlen pozitív Cotton-effektussal; c) egyetlen Cotton-effektushoz tartozó pozitív CD-görbe. A nátrium D vonala (589 nm) a polarimetriás mérések szokásos hullámhossza

A kiroptikai spektroszkópia legfontosabb felhasználási területe mind a mai napig a biopolimerek, elsősorban a polipeptidek és fehérjék térszerkezetének vizsgálata. MOFFITT az exciton modellen nyugvó elméleti megfontolások alapján levezetett egy egyenletet (Moffitt-egyenlet) [27], amely lényegében helyesen írta le a helikális polipeptidek ORD-spektrumát:

$$[M_{\lambda}] = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2}. \quad (2.1)$$

$[M_{\lambda}]$ az egy aminosavrészre számolt molekuláris forgatóképesség, a_0 , b_0 és λ_0 pedig paraméterek, amelyek közvetve kapcsolatba hozhatók az egyes excitonátmenetek hullámhosszával, illetve rotátorerősségével. Az egyenlet linearizált alakját grafikusán ábrázolva b_0 meghatározható. Tökéletes α -hélix szerkezet esetén b_0 -600 fok $\text{cm}^2 \text{dm}^{-1}$ körüli érték, míg a rendezetlen konformáció b_0 paramétere közelítőleg nulla. Az egyenlet — amelynek módosított formáit széles körben használták fehérjék α -hélix tartalmának becslésére — azért is jelentős, mert első ízben teremtett elméletileg megalapozott kapcsolatot egy biopolimer térszerkezete és optikai aktivitása között.

2.1. A PEPTID KROMOFOR KIRALITÁSA

A peptidek és fehérjék ismétlődő kromoforja az amidcsoport. Kézenfekvő, hogy a CD-spektrum 250 nm alatti tartományát az amidcsoport optikai aktivitása határozza meg, bár egyéb (pl. aromás) kromoforok királis hozzájárulása is számottevő lehet.

Az amidok *abszorpciós spektrumának* 180 nm feletti tartományában két elektronátmenet figyelhető meg. Az egyik a karboniloxigén nemkötő pályája (n) és az amidcsoport π lazító pályája közötti $n\pi^*$ elektronátmenet. Ez az átmenet elektromosan tiltott, így ϵ_{\max} értéke kicsi (általában $< 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Aprotikus oldószerben az $n\pi^*$ sáv 230 nm táján található. Protikus (erős H-kötés donor) oldószerekben hipszokrom eltolódást szenved, és egészen 210 nm-ig eltolódhat a spektrumban. Kis intenzitása miatt ritkán jelentkezik önálló sávként, többnyire a sokkal erősebb $\pi\pi^*$ átmenetre „épül rá” vállként.

Szekunder amidokban az első $\pi\pi^*$ sáv 190 nm táján jelentkezik (tercier amidokban ~ 200 nm-nél). A gerjesztés során a legmagasabb energiájú betöltött π pályáról kerül át az elektron a π^* pályára. A ciklohexán \rightarrow víz csere 2-3 nm batokrom eltolódással és az ϵ_{\max} 7000-ről 9000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ -re való növekedésével jár. A vízben mérhető nagyobb sáv szélesség miatt az oszcillátorerősség még nagyobb mértékben, 0,2-ről 0,3-ra növekszik.

Egy királis molekula minden egyes elektronátmenetének optikai aktivitását a Rosenfeld-egyenletben szereplő *rotátorerősség* határozza meg:

$$R_{0a} = \text{Im}[\mu_{0a} \cdot m_{a0}], \quad (2.2)$$

ahol μ_{0a} és m_{a0} az elektromos és mágneses átmeneti dipólus momentum vektorok és 0 az alap, a a gerjesztett állapotot jelöli. Mivel μ_{0a} valódi vektor, míg m_{a0} tisztán imaginárius, a rotátorerősség a két vektor skaláris szorzatának imaginárius része, vagyis $R_{0a}i = (-1)^{1/2}$ együtthatója. Másrészt viszont egy átmenet rotátorerőssége nem más, mint a CD-sáv alatti terület. Figyelembe véve a CD-sáv kis sáv szélességét, λ helyett λ_{0a} írható. Így egy Gauss-görbével közelíthető CD-sávra az

$$R_{0a} = (0,4389/\lambda_{0a}) \Delta\epsilon_{\max} \Delta_{0a} \quad (2.3)$$

kifejezés adódik, ahol Δ_{0a} a $\Delta\epsilon_{\max}/\epsilon$ -nek megfelelő félsáv szélesség. Ez a kifejezés azt jelenti, hogy jól elkülönült CD-sávok esetén

a kísérleti CD-paramétereiből a rotátorerősség egyszerűen kiszámítható.

Az amidcsoport planáris, elektromos átmeneti momentum vektora a szimmetriasíkban helyezkedik el. Így — még ha valamelyik átmenetének van is megengedett mágneses átmeneti momentuma — a két vektor szükségszerűen egymásra merőlegesen helyezkedik el, és skaláris szorzatuk nulla ($\cos 90^\circ = 0$). Ez összhangban van azzal a jól ismert kísérleti ténnyel, hogy akirális amidok nem mutatnak optikai aktivitást. Ha a molekula királis (az amidcsoport közelében kiralitáscentrum vagy egyéb királis molekularészlet található), úgy a királis környezet perturbálja a szimmetrikus (planáris) amidcsoport elektronátmeneteit, ami nullától különböző rotátorerősséget és mérhető optikai aktivitást eredményez.

Az amidcsoport elektronátmeneteinek szimmetriája különbözik egymástól. Az $n\pi^*$ átmenet „mágnesesen” megengedett, mágneses átmeneti dipólusmomentuma nagy (~ 1 BM) és a karbonilkötés mentén helyezkedik el, „elektromosan” tiltott, rezgési hatásoknak tulajdonítható elektromos átmeneti dipólusmomentuma kicsi és az amidsíkra merőlegesen polarizált. Az amidcsoport $\pi\pi^*$ átmenete ezzel szemben elektromosan megengedett, elektromos átmeneti dipólusmomentuma nagy és az amidsíkból fekszik, mágnesesen viszont tiltott, mágneses momentuma kicsi, és nagysága függ az amidcsoport központjának megválasztásától. Ami a legfontosabb, a mágneses momentum az amidsíkra merőlegesen polarizált, így akirális molekulákban egyik átmenet sem mutat optikai aktivitást.

Ha az amidcsoport a szomszédos amid- vagy más poláris csoportok által létesített királis elektrosztatikus térben helyezkedik el, úgy a két átmenet szimmetriájában mutatkozó különbség eltűnik. Az $n\pi^*$ átmenet egy kis $\pi\pi^*$ jellegre tesz szert (szerez vagy — Günther Snatzke szóhasználata szerint — „lop” egy kis síkban elhelyezkedő elektromos átmeneti dipólusmomentumot). Hasonlóképpen, a $\pi\pi^*$ az $n\pi^*$ átmenettel való keveredés következtében szert tesz a szimmetriasíkban elhelyezkedő mágneses átmeneti dipólusmomentumra. Így végeredményben mindkét átmenetnek lesz rotátorerőssége.

Az *összegszabály* ($\sum_a R_{0a} = 0$) [27] értelmében a rotátorerősség azonos nagyságrendű, de ellentétes előjelű. Ezt az egyetlen kromoforon belüli átmenet-keveredést hívják *egy-elektron mechanizmusnak* [28].

Az indukált rotátorerősség másik lehetséges forrása különböző, de egymáshoz térben közel elhelyezkedő kromoforok átmenetei közötti dinamikus csatolás. Az elektromos átmeneti dipólmomentum oszcilláló dipólust jelent, ami mágneses vagy elektromos átmeneti dipólusmomentumot indukálhat a szomszédos kromofor csoportban, az első esetet hívják μ - m csatolásnak [29]. Ez a mechanizmus érvényesül királis diketopiperazinokban.

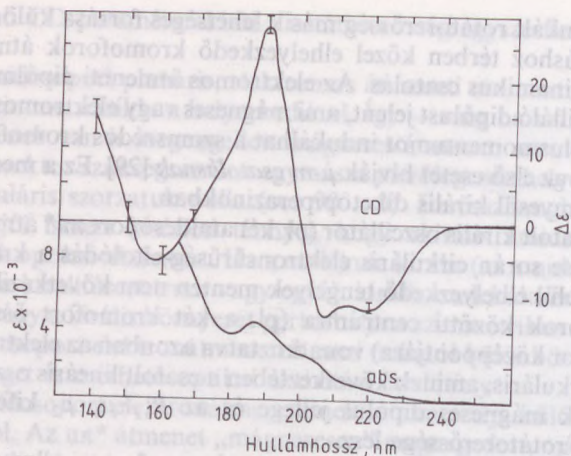
Két csatolt királis oszcillátor (pl. két amidcsoport $\pi\pi^*$ átmenetei) gerjesztése során cirkuláris elektronsűrűség-eltolódás a kromoforokon belül elhelyezkedő tengelyek mentén nem következik be. A kromoforok közötti centrumra (pl. a két kromofort összekötő R_{12} vektor középpontjára) vonatkoztatva azonban az elektroneltolódás cirkuláris, aminek következtében a csatolt lineáris oszcillátoroknak mágneses dipólus jellege és az $R_{12} \cdot \mu_1 \cdot \mu_2$ kifejezéssel arányos rotátorerőssége lesz.

Ha a rendszer két vagy több *azonos* kromofort tartalmaz, úgy a gerjesztett állapotok keveredése olyan erős lehet, hogy minden egyes monomer gerjesztett állapot nagymértékben delokalizálódik. Ezt az exciton elvet alkalmazta MOFFITT [30] a helikális polimerek abszorpciós ORD- és CD-spektrumainak értelmezésénél.

2.2. TÉRSZERKEZETI HATÁSOK: A MÁSODLAGOS SZERKEZETI TÍPUSOK (KONFORMÁCIÓK) CD-SPEKTRUMA

2.2.1. Az α -hélix

A peptidek és fehérjék CD-spektrumát döntő mértékben az α -hélix kiroptikai hozzájárulása határozza meg. Nem véletlen, hogy a szisztematikus kutatások kezdeti szakaszában az α -hélixet tekintették az egyetlen rendezett (periodikus) peptidkonformációnak. Az $n\pi^*$ átmenetnek 220 nm táján egy negatív sáv felel meg. A 190 nm-nél jelentkező $\pi\pi^*$ átmenet exciton felhasadása egy negatív-pozitív sávpárt (couplet-et) eredményez 208, illetve 192 nm-nél (2.3. ábra). A távolabbi ultraibolya tartományban egy pozitív váll jelentkezik (~ 175 nm-nél) és egy negatív sáv 160 nm alatt, ez utóbbi hozzárendelése bizonytalan, a 175 nm-es váll valószínűleg az $n\sigma^*$ átmenethez tartozik [12, 14].



2.3. ábra. Az α -hélix CD-spektruma [poli(Glu-OMe) hexafluor-2-propanolban mérve]. Alul az abszorpciós spektrum látható

Az α -hélix konformáció kiroptikai tulajdonságait legérzékenyebben homopolipeptideken tanulmányozták, többnyire a 185–250 nm-es hullámhossztartományban. Kiderült, hogy amennyiben az aminosav β -szénatomjához nem kapcsolódik kromofor csoport, úgy a CD-spektrum nem vagy csak kismértékben függ az oldallánc-tól és az oldószertől. Ez a megállapítás érvényes a távoli ultraibolya tartományra is, egészen 140 nm-ig. Helikális fehérjék CD-spektruma is nagyon hasonló, amennyiben az aromás aminosavak aránya nem több, mint $\sim 10\%$. Az aromás poliaminosavak — poli(Phe), poli(Tyr) és poli(Trp) — CD-spektruma az amid és aromás elektronátmenetek kölcsönhatása következtében jelentős különbségeket mutat. Perturbáló hatást távolabbi aromás csoportok nem okoznak, így pl. a poli[Glu(OBzl)] tipikus helikális CD-spektrumot mutat a távoli ultraibolya tartományban is.

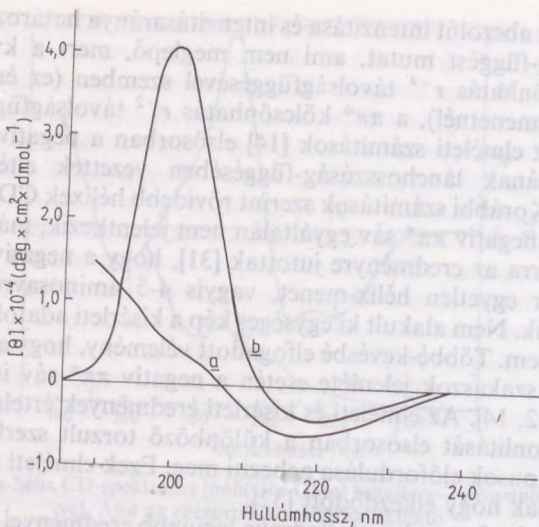
Az α -hélix CD-spektruma függ a lánchosszúságtól és — rövidebb helikális peptidek esetén — a végcsoportok királis hozzájárulásától. Az $n\pi^*$ átmenet rotátorerőssége negatív és viszonylag független a lánchosszúságtól: a 220 nm táján jelentkező sáv helyzete alig változik, de intenzitása monoton növekedést mutat 7–10 aminosavrészig, e fölött az intenzitásnövekedés lassú. A felhasadt

$\pi\pi^*$ sávok abszolút intenzitása és intenzitásaránya határozott lánchosszúság-függést mutat, ami nem meglepő, mert a kvadrupólus kölcsönhatás r^{-4} távolságfüggésével szemben (ez érvényesül az $n\pi^*$ átmenetnél), a $\pi\pi^*$ kölcsönhatás r^{-2} távolságfüggése dominál. Az elméleti számítások [14] elsősorban a negatív $\pi\pi^*$ sáv intenzitásának lánchosszúság-függésében vezettek eltérő eredményre. Korábbi számítások szerint rövidebb hélixek CD-spektrumában a negatív $\pi\pi^*$ sáv egyáltalán nem jelentkezik, más szerzők viszont arra az eredményre jutottak [31], hogy a negatív komponens már egyetlen hélix-menet, vagyis 4-5 aminosavréssz fölött megjelenik. Nem alakult ki egységes kép a kísérleti adatok értelmezésében sem. Többé-kevésbé elfogadott vélemény, hogy a rövidebb helikális szakaszok jelenléte esetén a negatív $\pi\pi^*$ sáv intenzitása kisebb [12, 14]. Az elméleti és kísérleti eredmények értelmezését és összehasonlítását elsősorban a különböző torzult szerkezetek és hélix-altípusok előfordulása nehezíti meg. Ezek elméleti tárgyalása éppen csak hogy elkezdődött [32].

A fehérje röntgenkristallográfia legújabb eredményei alapján az α -hélix mellett gyakorlati szempontból egyedül a 3_{10} -hélix ($\varphi = -60^\circ$, $\psi = -30^\circ$) érdemel figyelmet. Sok esetben az α -hélix kezdeti és zárószakasza egyetlen 3_{10} -hélix fordulat (III-as β -turn, 2.2.3. fejezet). Kifejezett 3_{10} -hélix tendenciát mutatnak az α -amino-izovajsavból (Aib) felépített homo- és kopolipeptidek. CD-spektrumukat többnyire trifluor-etanolban és metanolban vizsgálták. Valamennyi spektrumban két negatív sáv jelentkezett (~ 220 és ~ 205 nm-nél), ezek intenzitásaránya 1-nél kisebb volt, de viszonylag széles tartományban (0,30—0,85 között) mozgott. Úgy tűnik, hogy a CD-spektroszkópia nem alkalmas az α -hélix és a 3_{10} -hélix szerkezetek megkülönböztetésére.

2.2.2. A β -redőzött réteg (β -konformáció)

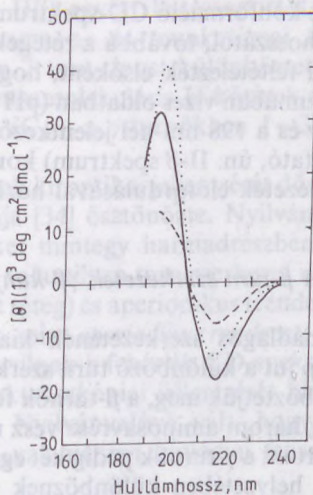
A β -redőzött konformáció CD-spektrumára egy negatív sáv jellemző 216 nm-nél és egy sokkal erősebb pozitív sáv 195—200 nm között (2.4. ábra). A spektrum sokkal változatosabb, mint az α -hélixé, ami arra vezethető vissza, hogy a β -redőzött réteg meglehetősen széles konformációs kategória. A β -láncok futhatnak párhuzamosan és ellentétes irányba (paralel és antiparalel β) és a rétegek globuláris fehérjékben sohasem planárisak, csaknem min-



2.4. ábra. Az Alzheimer-kór kialakulásáért felelős egyik fehérje, az amiloid vagy A4 11-25-ös fragmensének CD-spektruma a) trifluor-etanolban és b) vízben

dig csavartak (twisted). Korai elméleti számítások szerint a paralel és antiparalel β -konformáció CD-spektruma hasonló, APPLEQUIST szerint [13] a spektrumot döntő mértékben az oldalláncok határozzák meg.

Védett N- és C-terminális homooligopeptid filmek CD-spektrumának tanulmányozása arra az eredményre vezetett, hogy a β -spektrum kialakulásához minimálisan 5—7 aminosavrészre van szükség. A pozitív CD-sáv leszálló ága metszi az X tengelyt, a metszéspont helyzete a kereskedelmi forgalomban kapható készülékekkel meghatározható. Elméleti megfontolások alapján a 192 nm-nél mérhető metszéspont (crossover point) paralel β -konformációra utal, míg a 178 nm-nél jelentkező és csak VUCD (vákum ultraibolya CD) kimérhető metszéspont antiparalel irányítottságnak felel meg. WOODY mutatott rá arra, hogy a számítások rendkívül érzékenyen reagálnak a $\pi\pi^*$ átmenet amidcsoporton belüli helyzetének megválasztásától. Az újabb elméleti megfontolások eredményeképpen az a kép alakult ki, hogy a metszéspont helyzetét és a sávok intenzitásarányát döntő mértékben a réteg (illetve a β -láncok) csavartsága határozza meg [14, 33]. Erősen csavart β -ré-



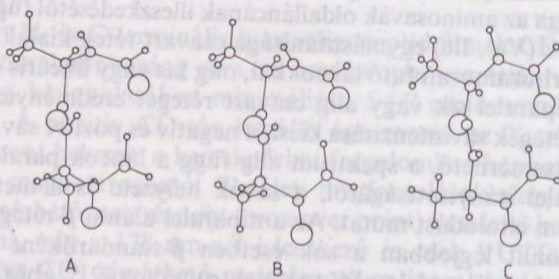
2.5. ábra. β -Redőzött réteg konformációjú polipeptidek CD-spektruma. (—), poli(Lys) pH = 11,1, 22 °C (15 perces 52 °C-on történő melegítés után); (---), poli(Lys) 1%-os nátrium-dodecil-szulfát-oldatban; (·····), poli(Lys-Leu-Lys-Leu) 0,1 M NaF-oldatban, pH = 7

teg CD-spektruma nagy sávintenzitásokat mutat, függetlenül a láncok paralel, illetve antiparalel irányítottságától. A réteg csavarodottsága az aminosavak oldalláncának illeszkedésétől függ: elágazó láncok (Val, Ile) egymásutánisága csavart réteg kialakulásához vezet párhuzamosan futó láncokkal, míg kis vagy lineáris oldallán-cok antiparalel sík vagy alig csavart réteget eredményeznek. Az alanin rétegek sávintenzitása kicsi, a negatív és pozitív sáv amplitú-dója összemérhető, a spektrum alig függ a láncok paralel, illetve antiparalel irányítottságától, a sávok helyzete és a metszéspont batokrom eltolódást mutat. Az antiparalel alanin β -réteg spektru-ma hasonlít legjobban a sok esetben β -standardként használt, ugyancsak antiparalel poli(Lys) spektrumához (2.5. ábra). Az erő-sen csavart valin rétegek $n\pi^*$ átmenete is megerősödik, de különö-sen megnő a pozitív $\pi\pi^*$ couplet intenzitása: a pozitív sáv 200 nm fölött jelentkezik, intenzitása 3×10^4 antiparalel, míg $6-7 \times 10^4$ fok $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ paralel rétegekben. Ugyancsak batokrom eltoló-dást mutat a metszéspont, általában 190 nm fölött található a spektrumban.

Függ a β -redőzött konformáció CD-spektruma a réteget alkotó láncok számától és hosszától, továbbá a rétegek számától is. FASMAN és munkatársai feltételezték elsőként, hogy a poli[Cys(CH₂-COOH)] CD-spektrumában vizes oldatban (pH=4,42) 227 nm-nél mérhető negatív sáv és a 198 nm-nél jelentkező pozitív sáv (batochrom eltolódást mutató, ún. II- β spektrum) konformációváltozást jelez és β -turn szerkezetek előfordulásával hozható összefüggésbe [14].

2.2.3. A β -turn szerkezetek (β -kanyarok)

A fehérjék harmadlagos szerkezetének kialakulásában („folding”) fontos szerep jut a különböző turn szerkezeteknek.* Két fő csoportjukat különböztetjük meg, a β -turnök felépítésében négy, a γ -turnökében pedig három aminosavrész vesz részt. Ez azt jelenti, hogy a β -turnök három, a γ -turnök pedig két egymás után következő amidik relatív helyzetében különböznek egymástól [33]. Az amidikok térbeli elhelyezkedése a β -turnök esetében a második és harmadik ($i+1$ és $i+2$), γ -turnöknél pedig a középső ($i+1$) aminosav φ és ψ torziószögeivel írható le. A Ramachandran-féle merev gömbös konformációs számításokat VENKATACHALAM terjesztette ki a β -turn szerkezetekre [8]. Lényegében három alapvető turn-típust (I—III) különböztetett meg (2.6. ábra), ami a tükörképi gerinckon-



2.6. ábra. A Venkatachalam-által definiált „ideális” I-es (A), II-es (C) és III-as β -turn (B). (lásd a 2.1. táblázatot)

* Az angol nyelvű szakirodalomban több szinonim elnevezés is használatos (turn, bend, reverse turn, U-turn stb.). A loop (hurok) más fogalom, > 4 aminosavrészből álló kanyarulatot jelent és építőkövei között lehetnek turnök is. Ebben a munkában a turn szó fordításától eltekintünk.

formációkkal (I'—III') együtt hat csoportot jelentett. A turnök csoportosítását SCHERAGA és munkatársai tovább finomították [10], munkájukban 7 turn-típust különböztettek meg (2.1. táblázat). A turnöket intramolekuláris H-kötések rögzítik, a β -turnökben 1 \leftarrow 4 H-kötés (C_{10}), a γ -turnökben 1 \leftarrow 3 H-kötés (C_7) található.

A turn szerkezetek kiroptikai jellemzését döntő mértékben CHOU és FASMAN munkája [34] ösztönözte. Nyilvánvalóvá vált, hogy a globuláris fehérjéket mintegy harmadrészben olyan aminosavak építik fel, amelyek valamilyen turn szerkezet részei és a periodikus (α -hélix, β -redőzött réteg) és aperiodikus (rendezetlen) konformációk mellett a turnök, mint *aperiodikus rendezett* szerkezetek jelentős mértékben hozzájárulnak a fehérjék CD-spektrumához. A turnök térszerkezeti és spektroszkópai jellemzését biológiai jelentőségük is sürgetővé tette. Nyilvánvalóvá vált, hogy a turnök szerepet játszanak csaknem valamennyi biológiai felismerési folyamatban [33].

Az elmúlt 15 évben több száz olyan munka jelent meg, amely a turnök spektroszkópai jellemzésével kapcsolatos, ezekben — főleg az NMR-spektroszkópia térhódítása előtt — nagy figyelmet kapott az egyes turn-típusok CD-spektruma. WOODY már 1974-ben megfogalmazta azt a két kérdést [35], ami mindmáig foglalkoztatja a fehérjék konformációja iránt érdeklődőket: 1. különbözik-e egymástól az egyes turn-típusok CD-spektruma és 2. lehet-e a fehérjék (vagy peptidek) CD-spektrumából a turnök jelenlétére és „mennyiségére” (számára) következtetni. WOODY számításai szerint a két legfontosabb és leggyakoribb turn-típus, az I-es és II-es β -turn CD-spektruma — a Venkatachalam-féle torziószögértékekhez közeli φ, ψ ($i+1, i+2$) torziószög-tartományban — a β -redőzött réteg spektrumához hasonlít, de a sávok batokrom eltolódást mutatnak: a gyenge negatív $n\pi^*$ sáv 230—220 nm, a domináns pozitív $\pi\pi^*$ sáv 210—200 nm között található a spektrumban és 190—180 nm között rendszerint megjelenik egy második, nagy intenzitású negatív sáv is (*B* spektrum, a standard β -redőzött réteg spektrumát *A*-val jelölte WOODY). A II' (a II-höz képest tükörképi gerinckonformációjú) β -turnök esetében a számítások szerint az α -hélix spektrumához hasonló, *C* spektrum várható. A modellvegyületek CD-spektrumának analízise jórészt alátámasztotta WOODY elméleti predikcióját (2.7. ábra). Rögzített (rendszerint gyűrűs szerkezetű) és röntgenkristallográfiai vagy NMR-vizsgálatok szerint II-es tí-

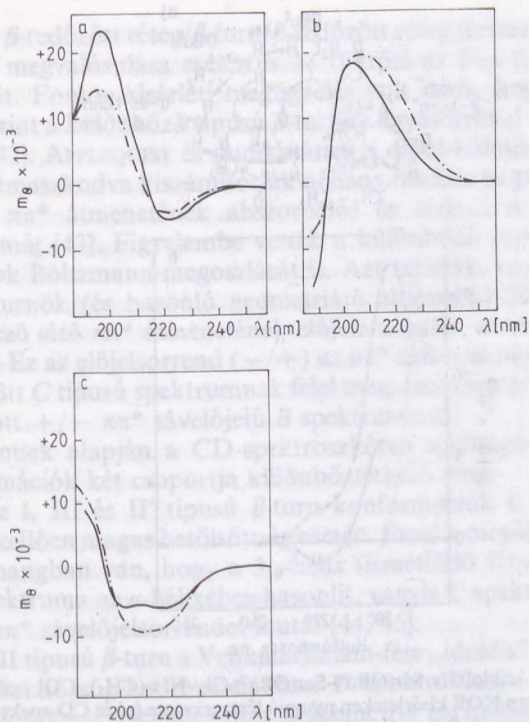
A turn szerkezetek típusai és előfordulási gyakoriságuk

Típus	Torziószögek (°)				Turnők száma ^a	H-kötéses turnők száma ^b	Definíció
	φ_2	ψ_2	φ_3	ψ_3			
<i>β-turnök</i>							
I	-60	-30	-90	0	176	99	
I'	60	30	90	0	13	10	
II	-60	120	80	0	64	43	30
II'	60	-120	-80	0	20	16	
III	-60	-30	-60	-30	77	45	
III'	60	30	60	30	13	7	
IV	Torzult I—III' turn (két vagy több torziószög legalább 40°-kal eltér a Venkatachalam-féle értékektől)				35	5	
V	-80	80	80	-80	3	0	
V'	80	-80	-80	80	4	2	
VI	csisz X-Pro kötés a 2. és 3. aminosavréz között				8	6	31
VII	$\psi_2 \sim 180$, $ \psi_2 < 60$, $ \varphi_3 < 60$ vagy $\varphi_3 \sim 180$				8	1	
Összesen					421	234	
<i>γ-turnök</i>							
γ -turn (axiális)	φ_2 70—85	ψ_2 (-60)—(-70)			c	c	14
inverz γ -turn (ekvatoriális)	(-70)—(-85)	60—70					
<i>γ-konformáció</i>	-60		140				

^a A turngyakorisági adatok 26 fehérje röntgendifrakciós analiziséből származnak. Turnők azok a nemhelikális tetrapeptid-konformációk, amelyekben a $C_i - C_{i+3}$ távolság $< 7\text{Å}$

^b A definíció értelmében azok a β -turnök tartalmaznak intramolekuláris H-kötést, amelyekben az $O_i - N_{i+3}$ távolság $\leq 3,5\text{Å}$

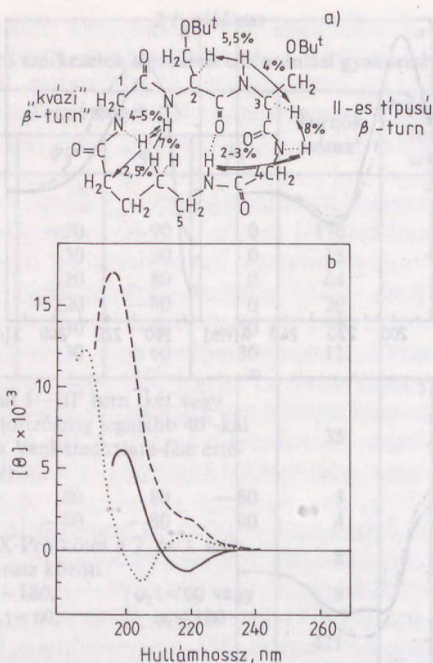
^c Turngyakorisági adatok nem ismeretesek



2.7. ábra. *B*-típusú CD-spektrum: ciklo(Ala-Pro-Gly)₂ (a); *C'*-típusú CD-spektrum: ciklo(D-Ala-Pro-D-Ala)₂ (b); *C*-típusú CD-spektrum: ciklo(Gly-Pro-Ala)₂ (c); vízben (---) és TFE-ben (—)

pusú β -turnt tartalmazó modellek CD-spektruma a *B* csoportba sorolható (2.8. ábra). A *C* spektrumot is sikerült kimérni II' típusú β -turnök esetében, továbbá az is összhangban volt az elméleti számításokkal, hogy $i+2$ helyzetben D-aminosavrészt tartalmazó β -turnök CD-spektruma a *C* spektrumhoz képest tükörképi, *C'* lefutást mutatott (2.7. ábra).

A modellvegyületek CD-spektruma nem volt összhangban azzal az elméleti következtetéssel, hogy az I-es β -turnök CD-spektruma is a *B* csoportba sorolható. BLOUT és munkatársai [36], majd SCHE-RAGA és több neves, az IR- és CD-spektroszkópiában jártas szakember gyűrűs modellvegyületeken végzett összehasonlító vizsgálá-



2.8. ábra. A ciklo[Gly-Ser(OBu^t)-Ser(OBu^t)-Gly-NH-(CH₂)₄-CO] ciklopeptid NMR, elsősorban NOE kísérleteken nyugvó térszerkezete (a) és CD-spektruma (b). Vízben kis intenzitású B típusú spektrum (—), metanolban C-típusú spektrum (---) és acetonitrilben több konformer elegyére utaló spektrum (·····)

tok alapján [37] arra következtetett, hogy az I-es típusú β -turnök CD-spektruma nem a B, hanem a C csoportba sorolható. HOLLÓSI és FASMAN szisztematikus vizsgálatokat végeztek különböző tag-számú lineáris és gyűrűs peptidokkal [38—40]. Infravörös, valamint ¹H és ¹³C NMR-spektroszkópiai vizsgálatokra támaszkodva igazolták, hogy a C csoportba sorolható CD-spektrum I-es, illetve a rokon III-as típusú β -turn konformáció jelenlétére utal. A vizsgálatokat a ciklo[Gly-Pro-Ser(O^tBu)-Gly-NH-(CH₂)₄-CO] modellvegyület kristályszerkezetének meghatározása zárta le [41]. Ebben a modellvegyületben egy „ideális” I-es típusú β -turn akirális δ -amino-valeriánsav-híddal gyűrűbe zárt antiparalel β -redőzött réteg konformációban folytatódik. A kiroptikai vizsgálatok szerint a különböző oldószerekben észlelt C spektrum — még a fehérjékben

gyakori β -redőzött réteg/ β -turn/ β -redőzött réteg térszerkezeti kombináció megvalósulása esetén is — tükrözi az I-es típusú β -turn jelenlétét. Fontos kísérleti megfigyelés volt az is, hogy oldatban rendszerint a különböző típusú β -turnök egyesúlyával kell számolni [41, 42]. APPLEQUIST és munkatársai a dipól-kölcsönhatási modellre támaszkodva kiszámították néhány lineáris és gyűrűs β -turn modell $\pi\pi^*$ átmenetének abszorpciós és cirkuláris dikroizmus spektrumát [43]. Figyelembe vették a különböző turn-típusok és altípusok Boltzmann-megoszlását is. Azt találták, hogy az I-es és III-as turnök (és hasonló geometriájú altípusok) 200 nm táján jelentkező első $\pi\pi^*$ átmenetének előjele negatív, a második pedig pozitív. Ez az előjelsorrend (-/+) az $\pi\pi^*$ átmenet negatív előjelével együtt C típusú spektrumnak felel meg, szemben a WOODY által számított +/- $\pi\pi^*$ sávelőjelű B spektrummal.

A fentiek alapján a CD-spektroszkópia segítségével a β -turn konformációk két csoportja különböztethető meg:

1. Az I, III és II' típusú β -turn konformációk C spektrumot adnak kellően magas betöltöttség esetén. Ezzel a megállapítással az is összhangban van, hogy a 3_{10} -hélix (ismétlődő III-as β -turnök) CD-spektruma az α -hélixéhez hasonlít, vagyis C spektrum szerinti -/+ $\pi\pi^*$ sávelőjelsorrendet mutat [44, 45].

2. A II típusú β -turn a Venkatachalam-féle „ideális”, vagy ahhoz közeli torziószög-kombinációkban B spektrumot, $i+2$ helyzetű D-aminosavréz jelenléte, vagy a geometria torzulása következtében viszont C' spektrumot eredményez.

2.2.4. A poli(prolin)-II hélixek

A prolin egyedülálló, rögzített gyűrűs térszerkezete két jellegzetes periodikus másodlagos szerkezetet eredményez. A poli(Pro)I hélix jobbmenetű, menetenként 3,3 *cis* peptidkötéssel összekapcsolt prolinrésszel ($\varphi = -70^\circ$, $\psi = 120^\circ$). Apoláris oldószerekben (pl. nagyobb tagszámú alkoholokban) stabilis. Vizes közegben és poláris oldószerekben inkább a poli(Pro)II szerkezet alakul ki. Ez egy balmenetű hélix, menetenként három, *transz* peptidkötéssel összekapcsolt aminosavrésszel ($\varphi = -70^\circ$, $\psi = 140^\circ$) [46].

A poli(Pro)I szerkezet CD-spektrumában 230 nm táján egy gyenge negatív $\pi\pi^*$ sáv, 215 nm-nél és ~ 200 nm-nél pedig egy pozitív és negatív $\pi\pi^*$ sávpár található. A II-es forma gyenge,

pozitív $\pi\pi^*$ sávja 226 nm-nél, erős negatív $\pi\pi^*$ sávja 206 nm-nél jelentkezik [14]. A poli(Pro) hélixek CD-spektrumának elméleti értelmezése még várat magára. A II-es hélix jelentősége lényegesen nagyobb. Az 50-es években vált ismeretessé, hogy a kollagén hármas szuperhélixének alegységei balmenetű poli(Pro)II konformációjú láncok, ezt támasztja alá a kollagén és a poli(Pro)II CD-spektrumának hasonlósága [47]. A kollagén kb. egyharmad részben tartalmaz prolint és hidroxiprolint, így az alegységes poli(Pro)II szerkezete nem meglepő. Hasonló szerkezetű szuperhélixek (coiled-coil szerkezetek) az építőkövei az idegsejtek neurofibrillumainak is [48]. Végül említést érdemel az is, hogy globuláris fehérjék rendezetlen szakaszai — legalábbis részben — poli(Pro)II szerkezetet mutatnak (2.2.5. fejezet).

2.2.5. Az aperiodikus (rendezetlen) konformáció

A periodikus rendezettséget nem mutató peptidek és fehérjék CD-spektrumában 200 nm táján egy változó erősségű negatív sáv található, amelyet 220 nm-nél egy negatív váll, vagy gyenge pozitív sáv kísér. Ilyen típusú spektrum gyakran mérhető rendezetlen térszerkezetű poliaminosavak vagy homopolipeptidek esetében, de többnyire ilyen a denaturált fehérjék CD-spektruma is. Könnyen belátható, hogy az aminosavrészek φ , ψ torziószögeinek „rendezetlensége” kis intenzitású és változatos „mintázattal” CD-spektrumot kellene hogy eredményezzen. A $\pi\pi^*$ tartományban található negatív sáv feltűnően nagy rotátorerőssége arra utal, hogy a φ , ψ torziószögek kiátlagolódása csak a Ramachandran-térkép egyes területein következhet be, vagyis bizonyos torziószög párok az átlagosnál lényegesen nagyobb gyakorisággal jelentkeznek. Újabb, röntgenkrisztallográfiai és spektroszkópiai vizsgálatok szerint a rendezetlennek tekintett fehérjeszakaszok — legalábbis részben — a poliprolin II konformációra jellemző, periodikusan ismétlődő torziószögeket ($\varphi = -70^\circ$, $\psi = 140^\circ$) vesznek fel [49, 50], ez magyarázza egyes szerzők szerint a poli(Pro)II hélix és a rendezetlen konformáció CD-spektrumának hasonlóságát.

2.3. AZ AROMÁS ÉS DISZULFID KROMOFOROK OPTIKAI AKTIVITÁSA

Az aromás aminosavak fenil-, hidroxi-fenil- és indolil-csoportjai, valamint a cisztin diszulfidcsoportja jellegzetes abszorpciós sávokat mutatnak a közeli (300—250 nm), illetve távoli (<250 nm) ultraibolya tartományban. A közeli ultraibolya tartományban jelentkező abszorpciós és CD-sávokat részletesebben tanulmányozták. A 250 nm alatti spektrumtartomány vizsgálata az oldallánc- és peptidgerinc-kromoforok sávjainak átfedése miatt mindmáig nehézségekbe ütközik.

PLATT szerint [51] benzolban a kétszeresen elfajult HOMO pályák és ugyancsak kétszeresen elfajult LUMO pályák erős keveredése két nem-elfajult, tiltott átmenetet eredményez. Ezek a növekvő energia sorrendjében az L_b (260 nm, $\epsilon_{\max} \cong 10^2$) és L_a -sáv (210 nm, $\epsilon_{\max} \cong 10^4$). A benzol esetében a 180 nm-nél jelentkező sáv ($\epsilon_{\max} \cong 5 \times 10^4$) a megengedett, kétszeresen degenerált B_a és B_b állapotoknak felel meg.

A *fenil-alanin* benzol-kromoforját az alkillánc gyengén perturbálja. Az L_b -sávra rezgési finomszerkezet jellemző, ez poláris közegben is észlelhető és alkalmas a fenil-alanin azonosítására. Az L_b -sáv elektromosan és mágnesesen is tiltott, így a CD-sáv gyenge, a vibrációs átmenetek előjele esetenként ellentétes. Az L_a -sávról kevesebbet tudunk. Elméleti számítások szerint tekintélyes rotátorerősség alakulhat ki a szomszédos amidcsoportokkal való csatolás eredményeképpen [14].

A *tirozin* CD-spektrumában az L_b és L_a -sáv az OH-csoport erős konjugációs hatása következtében kb. 20 nm-es batokrom eltolódással 280, illetve 225 nm-nél jelentkezik, az L_b -sáv intenzitása is lényegesen megnő ($\epsilon_{\max} \cong 1500$). A B_a -sávra gyakorolt hatás kisebb. A fenolos OH-csoport disszociációja további batokrom eltolódást okoz: az L_b -sáv lúgos közegben 295, míg az L_a -sáv 245 nm-nél található. A vibrációs finomszerkezet kevésbé kifejezett, mint a fenil-alaninnál, főleg poláris közegben. Tirozin-peptidokban az L_a -sáv a peptidcsoportokkal való kölcsönhatás következtében megerősödik, előjele általában pozitív.

A *triptofán* L_b és L_a átmenetei 260 nm fölött jelentkeznek a spektrumban. Sorrendjük felcserélődhet, az L_b -sávnak határozott finomszerkezete van [14]. A B_b -sáv 225, a B_a -sáv 195 nm körül jelenik meg, a B_b -sáv előjele általában pozitív.

A diszulfidcsoport a *gauche* konformációt kedveli ($\chi_{ss} \cong \pm 90^\circ$), ez a torziószög jobb (P), illetve bal csavarodású (M) „hélixnek” felel meg. A közeli ultrabolyában két $n\sigma^*$ átmenet található. 90° körüli torziószögeknél ezek elfajultak, így az ultrabolya spektrumában 260—250 nm között egyetlen széles sáv jelenik meg. A sáv helyzete függ a χ_{ss} torziószögtől, ez fokozottan érvényes a CD-spektrumra, ahol az átmenetek rotátorerőssége ellentétes, amplitúdójuk összemérhető ($\epsilon_{\max} = 100\text{—}500$). A torziószög abszolút értékének csökkenése, illetve növekedése a két $n\sigma^*$ átmenet energiájának jelentős különbségéhez vezethet. *Cis*z diszulfidokban a kisebb energiájú komponens 350 nm-ig is eltolódhat.

Korán felismerték, hogy a nagyobb hullámhossznál jelentkező CD-sáv előjeléből következtetni lehet a diszulfid kromofor helicitására, vagyis a χ_{ss} torziószög előjelére és értékére. A térállás lehet *ciszoid* $|\chi| = 15\text{—}75^\circ$ és *transzoid* $|\chi| > 105^\circ$. *Ciszoid* esetben a nagyobb hullámhossznál található sáv előjele *pozitív* pozitív torziószögeknél és *negatív* negatív torziószögeknél. *Transzoid* esetben az előjelviszonyok ellentétesek. Az $n\sigma^*$ sáv nagyobb energiájú kis $|\chi|$ torziószögeknél, vagyis *ciszoid* diszulfidokban hipszokrom eltolódást szenved, λ_{\max} értéke 240 nm is lehet.

2.4. A MÁSDOLGOS SZERKEZET MEGHATÁROZÁSA A CD-SPEKTRUM ALAPJÁN

A kiroptikai spektroszkópia fejlődésére nagy hatást gyakorolt az a megfigyelés, hogy a helikális és rendezetlen másodlagos szerkezettű szintetikus polipeptidek ORD-spektruma jelentősen különbözik egymástól. A Moffitt-egyenletben szereplő b_0 az oldószertől és a térszerkezettől független paraméter, helikális polipeptideknél $b_0 \cong -600$, míg rendezetlen polipeptideknél $b_0 \cong 0$ fok $\text{cm}^2 \text{dm}^{-1}$ (2. fejezet). Az a nézet uralkodott, hogy a fehérjékben — néhány fibrilláris típustól (pl. β -keratin, selyem fibroin) eltekintve — az α -hélix az egyetlen szabályos másodlagos szerkezet. Ez vezetett az α -hélix tartalom és a b_0 mennyiség közötti alábbi képlethez:

$$\% \text{ hélix} = \frac{-b_0(\text{kísérleti})}{630} 100. \quad (2.4)$$

Ilyen és hasonló „skalázású” összefüggéseket a hatvanas évek közepéig használtak a fehérjék és polipeptidek helicitásának becslésére [12].

A CD-készülékek elterjedésével egy időben ismerték fel a β -redőzött réteg konformáció szerepét, pontosabban fogalmazva azt, hogy β -redőzött láncszakaszok globuláris fehérjékben is előfordulhatnak. (A harmadik szerkezeti típus a „rendezetlen” konformáció volt.)

Az additivitási elv értelmében a kísérleti CD-spektrum nem más, mint a különböző másodlagos szerkezetek (konformációk) CD-spektrumának súlyozott összege:

$$A(\lambda) = \sum_{i=1}^n f_i A_i(\lambda). \quad (2.5)$$

A fentiek értelmében a CD-görbét kezdetben három komponensre (α -hélix, β -redőzött réteg, rendezetlen) bontották. Mivel nempeptid kromofort (aromás csoportot, diszulfidkötést stb.) tartalmazó oldalláncok a fehérjéket felépítő aminosavakban viszonylag ritkák ($\leq 10\%$), CD hozzájárulásuk a 250 nm alatti spektrumtartományban az amidcsoportokéhoz képest elhanyagolható. A CD-spektrum háromkomponensű felbontását és a megfelelő kísérleti körülmények között helikális, β -redőzött és rendezetlen másodlagos szerkezetű poli(L-lizin) CD-spektrumainak bázis- vagy referenciaspektrumként ($A_i(\lambda)$) való alkalmazását GREENFIELD és FASMAN javasolták elsőként [52]. Ha elfogadjuk, hogy a referenciaspektrumok nem a poliaminosavra, hanem a különböző konformációtípusokra jellemzők, és a CD-spektrum nem tartalmaz más konformációkhoz, illetve kromofor csoportokhoz rendelhető információt, úgy $\sum f_i = 1$ peremfeltétel mellett a görbefelbontás minden nehézség nélkül elvégezhető, és a három alapkonzormáció százalékos részesedése megbecsülhető. Ha csak a százalékos α -hélix tartalomra vagyunk kíváncsiak, úgy az a 208 nm-nél mért ellipticitásból egy egyszerű képlet segítségével kiszámítható:

$$\alpha(\%) = \frac{|[\Theta]_{208}| - 4000}{33\,000 - 4000}. \quad (2.6)$$

A módszer elterjedése annak köszönhető, hogy röntgenkristallográfiai módszerrel is jellemzett globuláris fehérjék esetében a kristályos állapotban talált α -hélix tartalom általában jó egyezésben volt

az oldatban kialakuló térszerkezet CD-spektroszkópiával becsült helicitásával. Ez azt is jelentette, hogy a fehérjék szilárd fázisban és oldatban kialakuló másodlagos és harmadlagos szerkezete nem különbözik jelentősen egymástól, vagyis a „kristálykonformáció” lényegében megegyezik a fehérjék oldatban, természetes (fiziológiás) körülmények között megvalósuló térszerkezetével.

A háromkomponensű görbefulbontásra és az α -hélix tartalom becsülésére javasolt egyéb módszerekről a WOODY [14], valamint a YANG és munkatársai [12] által írt kitűnő összefoglalókban olvashatunk bővebben.

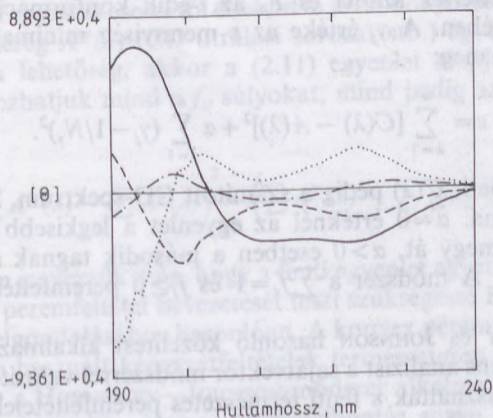
A hetvenes évek közepétől nyilvánvalóvá vált, hogy a globuláris fehérjék aminosavrészeinek 30—35%-a a különböző típusú turnök alkotórészeként szerepel [34]. Ezt felismerve S. BRAHMS és J. BRAHMS 1980-ban az (2.5) egyenletet kezdetben három ($n=3$), később egyetlen *átlagos turnaggal* bővítették ki [11]. A turntag részttagokra való bontásáról azért mondtak le, mert a módszer ellenőrzése során azt tapasztalták, hogy az illesztés és a különböző konformációk becslése nem javítható, ha egy helyett három turntag szerepel az egyenletben. A poli(Ala₂Gly₂) vízben mért CD-spektrumának sávintenzitásait önkényesen felére csökkentették és ezt a spektrumot fogadták el a β -turnök CD hozzájárulásaként ($A_i(\lambda)$). Feltűnő, hogy a három, kezdetben javasolt turntag és az átlagos turn-hozzájárulás egyaránt B típusú CD-spektrum, ami azt is jelenti, hogy a különböző típusú β -turnök CD-spektruma — WOODY korai félempirikus kvantumkémiail számításaival összhangban — nem különbözik egymástól.

A görbefulbontó módszerek javításának következő állomása a bázisspektrumok megválasztásának módosítása volt. Kezdetben újabb poliaminosavak CD-spektrumával próbálkoztak [12], de hamarosan kiderült, hogy jobb eredmények érhetőek el, ha a referenciaspektrumok ismert kristályszerkezetű fehérjék CD-spektrumából származnak. Háromkomponensű görbefulbontás esetén az (2.5) egyenletben szereplő $A_i(\lambda)$ alspektrumok meghatározásához minimálisan három egyenletre és — a szilárd állapotban és oldatban fellépő konformációk, azaz az f_i tagok azonosságát feltételezve — legalább három ismert röntgengeometriájú fehérjére van szükség. A fehérjék CD-spektrumán alapuló közelítéseknek számos válfaja ismeretes, ezek a választott fehérjék számában és fajtájában, valamint az alspektrumok kiszámításának módjában különböznek egymástól [12, 14]. Előrelépést jelentett a lánchosszúságtól

függő α -hélix tag:

$$A_n \bar{n}(\lambda) = A_n \infty(\lambda) (1 - k/\bar{n}) \quad (2.7)$$

(\bar{n} és ∞ az n átlagos tagszámú, illetve végtelen hosszúságú α -hélix CD hozzájárulását jelenti) [53], továbbá a fehérjék CD-spektrumából becsült β -turn tag bevezetése [12, 14, 54]. A Jasco J720 CD készülékek görbefulató programja a Yang-féle algoritmust használja [54]. Az $A_i(\lambda)$ β -turn referenciaspektrum egy 224 nm-nél jelentkező pozitív sávval, egy második 200 nm körüli pozitív és egy 190 nm alatti erős negatív sávval jellemezhető (2.9. ábra). Ez a spektrum a 224 nm-es sáv pozitív előjelétől eltekintve ismét a Woody-féle B-típusú CD-spektrumra emlékeztet. A 224 nm-es sáv pozitív előjelét valószínűleg az aromás aminosavak CD hozzájárulása okozza, és így a javasolt görbe nem hozható kizárólagos kapcsolatba a β -turnök jelenlétével és számával. A röntgenkristallográfiai és CD-spektrumból nyert adatok (f_i^R és f_i^{CD}) összehasonlítását megnehezíti a peremfeltételek különböző megválasztása és az f_i -értékek különböző módon és szigorúsággal történő meghatározása a röntgenkristallográfiai adatokból. Ha a CD-görbék felbontásánál megengedünk nem természetes peremfeltételeket is (pl. $-1 \leq f_i \leq 1$), úgy az összehasonlítás érthető módon nehézségekbe ütközik. Ismert például, hogy az α -hélixek kezdeti és záró-



2.9. ábra. A Yang-féle algoritmus referenciaspektrumai: (—), α -hélix; (- · - ·), β -redőzött réteg; (---), aperiodikus vagy rendezetlen és (- - - - -) β -turn konformáció

szakasza nem tekinthető ideálisnak, a φ , ψ torziószögek kisebb-nagyobb mértékben eltérnek a -55° , -45° átlagértékektől, továbbá az α -hélixet gyakran egy 3_{10} helikális fordulat zárja le (-60° , -30°). Ez bizonytalaná teszi az α -hélix százalékos arányát megadó f_α^R paraméter (hélixtartalom a „kristálykonformációban”) kiszámítását. A turnók esetében az sem egyértelmű, hogy hány aminosavrészt számolunk egy β -turn egységhez: vannak érvek 2, 3 és 4 aminosavrésszel egyaránt. A röntgenkristallográfiai adatok értelmezése terén BOLOTINA összehasonlító munkái érdemelnek említést [55].

A bázisspektrumok megválasztása terén jelentkező nehézségeket talán a Provencher—Glöckner-módszer küszöböli ki a legsikeresebben [56]. Ez ismert röntgenkristallográfiai szerkezetű fehérjék CD-spektrumainak lineáris kombinációjaként állítja elő a vizsgált fehérje CD-spektrumát:

$$A(\lambda) = \sum_{j=1}^{N_\gamma} \gamma_j R_j(\lambda) \quad (2.8)$$

$$f_i = \sum_{j=1}^{N_\gamma} \gamma_j F_{ji}, \quad (2.9)$$

ahol $R_j(\lambda)$ a j -edik bázis- vagy referenciafehérje CD-spektruma, N_γ a bázisfehérjék száma és F_{ji} az i -edik konformáció súlya a j -edik fehérjében. A γ_j értéke az ε mennyiség minimalizálásával határozható meg:

$$\varepsilon = \sum_{\lambda=1}^n [C(\lambda) - A(\lambda)]^2 + \alpha \sum_{j=1}^n (\gamma_j - 1/N_\gamma)^2. \quad (2.10)$$

$A(\lambda)$ a kísérleti, $C(\lambda)$ pedig a számított CD-spektrum, n az adatpontok száma. $\alpha=0$ értéknél az egyenlet a legkisebb négyzetes közelítésbe megy át, $\alpha>0$ esetben a második tagnak stabilizáló szerepe van. A módszer a $\sum f_i = 1$ és $f_i \geq 0$ peremfeltételeket alkalmazza.

HENNESSEY és JOHNSON hasonló közelítést alkalmaztak, de a sokkomponens analízist a sajátvektor módszerrel valósították meg [57]. Nem használták a fenti természetes peremfeltételeket, a $\sum f_i$ mennyiséget csak az analízis után normálták 1-re az összehasonlítás megkönnyítése céljából. A mátrixszámításon alapuló analízis ortogonális bázisspektrumokat eredményez — ezek abban külön-

bőznek egymástól, hogy a hullámhossztengelyt növekvő számban metszik. A nulla metszéspontnak a 250—180 nm-es spektrumtartományban végig negatív spektrum felel meg, egy metszéspont esetén a görbe 200 nm-ig negatív, ez alatt pozitív stb. A módszer a peremfeltételek nem-természetes megválasztásán túlmenően azért is számos kritikát kapott, mert az ortogonális bázisspektrumok alakja nem hozható kapcsolatba a fehérjekonformációk közismert CD-spektrumával (egyetlen kivétel az egymetszéspontú alspektrum, amely hasonlít az α -hélix CD-spektrumára). Mindkét módszernek ismeretes továbbfejlesztett változata [58], de ezek nem különböznek lényegesen a fentiekben ismertetett alapeljárásoktól.

A korábban említett két, alapjaiban különböző CD-görbe analízáló algoritmus előnyös tulajdonságait kívánta egyesíteni a „CD analysis” programrendszer [59]. A programcsomag két részből áll (*LINCOMB* és *CONVEX PEREMFELTÉTELŰ ANALÍZIS*), amelyet grafikus modulok tesznek könnyen alkalmazhatóvá.

Amennyiben a (2.5) egyenletben szereplő $A_i(\lambda)$ függvények explicit formája ismert, úgy a mért CD-spektrumhoz ($A(\lambda)$) tartozó f_i koefficiensek meghatározhatók. (A matematikai analízist megkönnyíti egy „zaj” tag beiktatása.) A *LINCOMB* program ilyen típusú feladatok megoldását teszi lehetővé.

A gyakorlatban azonban a konformációs súlyok mellett az $A_i(\lambda)$ függvények is általában ismeretlenek, éppen ezért a feladat megoldása speciális esetektől eltekintve jóval bonyolultabb. Ha egy spektrumsereg $A^m(\lambda)$ (CD-titrálási sorozat stb.) együttes analízisére nyílik lehetőség, akkor a (2.11) egyenlet alapján egyszerre meghatározhatjuk mind a f_{ij} súlyokat, mind pedig az $A_i(\lambda)$ függvényeket:

$$\left(\sum A^m(\lambda) - \sum A^c(\lambda) \right)^2 = \left(\sum A^m(\lambda) - \sum \sum f_{ij} A_i(\lambda) \right)^2. \quad (2.11)$$

Zárójelben jegyezzük meg, hogy a fenti egyenlet egyetlen megoldása három peremfeltétel bevezetését teszi szükségessé HENNESSEY és JOHNSON elgondolásához hasonlóan. A konvex peremfeltételű analízis során használt kényszerfeltételek természetesen mások, mint amelyeket a HENNESSEY—JOHNSON-módszer alkalmaz. Éppen ez a különbség biztosítja, hogy a görbefelbontás során kapott $A_i(\lambda)$ függvények spektroszkópiai szemszögből nézve sokkal könnyebben értelmezhetők.

A CD-görbék felbontására használt valamennyi módszer közös vonása az, hogy a röntgenkrisztallográfiai adatokból számított f_i^R és az f_i^{CD} súlyok az α -hélix esetében jó, a β -redőzött réteg konformációnál elfogadható egyezést mutatnak (leggyakrabban a Pearson-féle korrelációs együtthatókat használják [14]). Lényegében egyik módszer sem alkalmas a β -turnök „mennyiségének” becslésére. A kereskedelmi forgalomban kapható korszerű CD-spektrométerek közül a Jasco J720 készüléket a Yang-féle, míg a Jobin—Yvon VI-os dikrográfot a Provencher—Glöckner programcsomaggal szállítják.

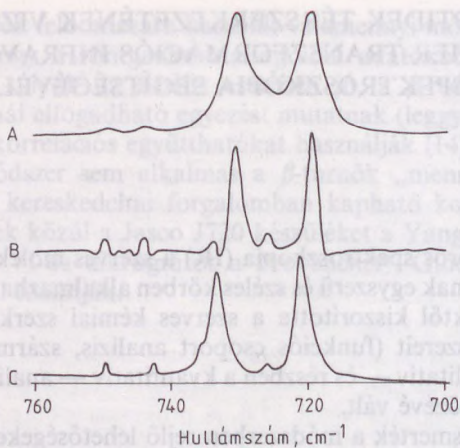
3. POLIPEPTIDEK TÉRSZERKEZETÉNEK VIZSGÁLATA FOURIER-TRANZFORMÁCIÓS INFRAVÖRÖS SPEKTROSKÓPIA SEGÍTSÉGÉVEL

Az infravörös spektroszkópia (IR) a szerves molekulák szerkezetvizsgálatának egyszerű és széles körben alkalmazható módszere. A 60-as évektől kiszorította a szerves kémiai szerkezetvizsgálat kémiai módszereit (funkciós csoport analízis, származékkészítés stb.) és a kvalitatív — és részben a kvantitatív — analízis nélkülözhetetlen eszközévé vált.

Korán felismerték a módszerben rejlő lehetőségeket a peptidok és fehérjék másodlagos szerkezetének vizsgálata terén is [60, 61]. A módszer elterjedését elsősorban gyakorlati okok: az infravörös spektrométerek kis érzékenysége és a közeg (szerkezeti anyagok, oldószer stb.) abszorpciójának zavaró hatása késleltették. A legnagyobb nehézséget a szerkezeti információ „kinyerése” jelentette. A Fourier-transzformációs infravörös (FT-IR) spektrométerek elterjedésével jelentősen megváltozott a helyzet. Ezek a készülékek jelentősen javították a jel/zaj viszonyt és megkönnyítették az adatok feldolgozását is.

A legnagyobb problémát azonban az jelenti, hogy a konformációra érzékeny amidsavokban a különböző másodlagos szerkezetekre, így az α -hélixre, rendezetlen konformációra, β -redőzött rétegre stb. jellemző sávkomponensek erősen átfednek. Ennek az az oka, hogy a sávkomponensek sáv szélessége inherensen nagy (nagyobb, mint az egyes komponensek maximuma közötti spektrális távolság), így a komponensek nem különülnek el világosan a spektrumban, általában azonosításuk is nehézségekbe ütközik. Korábban a másodlagos szerkezetekre vonatkozó információt az összetett sávok (pl. amid I sáv) alakjából nyerték, jó esetben optimalizációs analízis segítségével [62]. Érthető okokból ezek a módszerek bizonytalanok voltak a sávkomponensek számát és eredetét illetően is, nem beszélve viszonylagos „mennyiségükről”, pontosabban az egyes konformációtípusok arányáról.

Jelentős előrelépést jelentett a felbontást javító számítástechnikai módszerek bevezetése. Ezek a Fourier-transzformáció adta



3.1. ábra. (A), a nonadekán IR-spektruma szilárd állapotban (282 K); (B), az A spektrum Fourier-öndekonvolúció (FSD) után, feltételezett félsávszélesség $3,4 \text{ cm}^{-1}$, $K=2$ (K a felbontásjavulási tényező); (C), a nonadekán IR-spektruma 77 K-on

lehetőségeket használják ki, és a felbontást a sávszélesség matematikai úton történő csökkentésével javítják. Két válfajuk ismeretes, az egyik a Fourier-öndekonvolúció (Fourier self-deconvolution, FSD), a másik a Fourier-deriválás. Fontos hangsúlyozni, hogy egyik módszer sem befolyásolja a készülék felbontását, hanem a sávszélesség csökkentésével javítja a sávkomponensek elkülönülését a spektrumban (3.1. ábra). Lényegében hasonló a helyzet, mint az alacsony hőmérsékleten (100 K alatt) felvett spektrumoknál, ahol a sávszélesség-csökkentés a Lorentz-féle ütközési folyamatok tompításával érhető el.

Jelen összeállítás kereteinél fogva nem alkalmas a Fourier-transzformáción alapuló matematikai eljárások részletes tárgyalására. Két munkára szeretnénk felhívni az érdeklődők figyelmét, mindkettő tudományos alapossággal, de érthető formában tárgyalja a probléma elméleti és gyakorlati vonatkozásait egyaránt [62, 63].

SUSI és BYLER közölték és analizálták elsőként fehérjék megnövelt felbontású FT-IR-spektrumát [64]. Az azóta eltelt 10 év során jelentős elméleti és kísérleti anyag gyűlt össze. A sávszélesség-szűki-

tés különböző matematikai lehetőségei közül a leghatékonyabbnak az FSD bizonyult.*

A polipeptidek infravörös spektrumában 9 jellemző amid rezgési mód (csoportfrekvencia) figyelhető meg. A másodlagos szerkezet analízisére legeredményesebben az amid I sáv ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) használható. Az amid II és III sáv ugyancsak tartalmaz térszerkezeti információt, de az amid II sáv esetében a hozzárendelés, illetve konformációérzékenység kérdése a mai napig nincs megnyugtatóan tisztázva, míg az amid III sávnál a kis intenzitás okoz gondot. (Az amid III sáv lényegesen erősebben jelentkezik a Ramman-spektrumban.)

Az amid I sáv elsődlegesen az amidcsoport $\text{C}=\text{O}$ vegyértékrezgésével hozható összefüggésbe, bár a rezgés csatolásban van a síkban deformációs NH és CN nyújtási módokkal. A sáv frekvenciája függ az amidcsoport által létesített H-kötések erősségétől, ami viszont jellemző a különböző másodlagos szerkezeti típusokra. Ahogy a CD-spektroszkópia esetében, az infravörös spektrumok értelmezésénél is a nagyjából homogén konformációjú homopolipeptidekre támaszkodtak kezdetben. A sáv szélesség csökkentésére alkalmas Fourier és egyéb technikák elterjedése után lehetőség nyílt ismert, pontosabban röntgenkrisztallográfiai módszerrel jellemzett térszerkezetű fehérjék FT-IR-spektrumának összehasonlító vizsgálatára. A hozzárendelést sok esetben normálkoordinátaanalízis is megalapozta [65].

A másodlagos szerkezet és az FT-IR-spektrum közötti kapcsolatot BYLER és SUSI [66], valamint más laboratóriumok kutatóinak szisztematikus munkássága nyomán [62] legmegnyugtatóbb módon fehérjék nehézvízben (D_2O) mért spektrumai esetében tisztázták. A D_2O pufferoldatokban mért fehérjespektrumok amid I sávja jellegzetes és viszonylag szűk sáv tartományokra bontható, ezek meglehetősen biztonságosan rendelhetők hozzá a főbb másodlagos szerkezeti típusokhoz. Az $1658\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ tartomány az α -hélix konformációra jellemző, az aperiodikus (rendezetlen) szakaszok amid I sávja $1648\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ között található. Ez a sáv általában széles az FSD spektrumokban is, ami arra utal, hogy ebben a tartományban különböző konformációs altípusok vagy szolvatáltsági fokú amidcsoportok sávkomponensei összegeződ-

* Eredményesen használható görbeillesztési algoritmust dolgoztak ki HOLLY SÁNDOR és munkatársai (MTA, KKKI).

nek. Vizes pufferoldatokban az aperiodikus sáv $1660\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ között jelentkezik és általában nem különül el az α -hélix komponensről.

Az $1640\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$ közötti tartomány sok szerző véleménye szerint a β -redőzött réteg konformációra jellemző [65–68], de a β -komponens jelentkezhethet 1620 cm^{-1} alatt is és az is előfordul, hogy ebben a tartományban több mint egy β -sáv található. Összefüggésbe hozható egy nagy hullámszámmértékeknél ($1695\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$) jelentkező, rendszerint gyenge sáv is a β -redőzött réteg konformációval [62], ezt a hozzárendelést elméleti számolások is alátámasztják [65]. Egyes szerzők szerint ez a komponens a β -redőzött láncok antiparalel irányítottságával kapcsolatos [62]. A β -redőzött réteg konformáció az α -hélixnél lényegesen szélesebb térszerkezeti kategória, az egyes altípusok (pl. csavart szerkezetek, vö. a 2. fejezettel) infravörös spektroszkópiái jellemzése további szisztematikus vizsgálatot tesz szükségessé.

Az 1660 cm^{-1} feletti amid spektrumtartományban rendszerint számos gyenge sávkomponens található. Ezekről — elsősorban az 1665 cm^{-1} -es sávról — korábban feltételezték, hogy különböző turnszerkezetekhez tartoznak [62]. Az 1665 cm^{-1} -es frekvencia elméleti számítások szerint [65] egybeesik a 3_{10} -hélix ugyancsak 1665 cm^{-1} -nél várható sávjával. Nagyobb gondot okoz az, hogy a turnök egyik rezgési módja a számítások szerint 1656 cm^{-1} -nél, az α -hélix tartományban várható (vö. a 3.1.4. fejezettel), továbbá, hogy ugyanitt jelentkezhethet egy hurok (loop) szerkezetekre jellemző sáv is [68].

Az FSD infravörös spektrumok amid I tartománya — a hozzárendelés terén esetenként tapasztalható bizonytalanságok ellenére — alkalmas a különböző másodlagos szerkezetek azonosítására. Nem szabad azonban elfeledkezni arról, hogy az FSD-spektrumokból levonható információ szigorúan kvalitatív jellegű: a sávintenzitások aránya függ a mért spektrum komponenseinek sávszélességétől és az alkalmazott sávszűkítő eljárás paramétereitől [63]. Ugyanez érvényes a Fourier-derivált spektrumokra is.

A mennyiségi analízist a különböző *görbeillesztési módszerek* teszik lehetővé. Célszerű a λ_{\max} -értékeket és a komponens-spektrumok számát az FSD vagy Fourier-derivált spektrumok alapján megválasztani (3.1. ábra). Az iteratív eljárás során megkapjuk az összetevők intenzitását és a félsáv szélességet. Az egyes másodlagos szerkezetípusok viszonylagos mennyiségére a görbe alatti terüle-

tek (integrált intenzitások) arányából lehet következtetni. A CD-spektrumok analizésének mintájára szokás „százalékos konformációkat” is megadni:

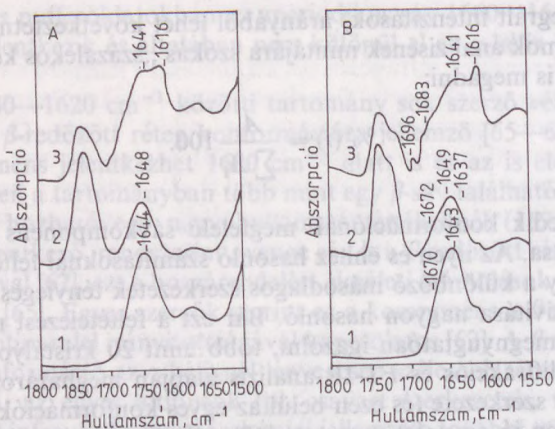
$$\% (i) = \frac{A_i}{\sum A_i} 100. \quad (3.1)$$

A_i az i -edik konformációnak megfelelő sávkomponens integrált intenzitása. Az ilyen és ehhez hasonló számításoknál feltételezzük azt, hogy a különböző másodlagos szerkezetek tényleges intrinszc abszorptivitása nagyon hasonló. Bár ezt a feltételezést még nem sikerült megnyugtatóan igazolni, több mint 20 kristályos fehérje röntgendiffrakciós és FT-IR-analízis alapján meghatározott másodlagos szerkezete (és ezen belül az egyes konformációk aránya) meglepően jó egyezést mutatott [62, 66]. A CD-spektroszkópián alapuló konformációanalízissel összevetve az FT-IR módszer előnye az, hogy nem támaszkodik ismert másodlagos szerkezetű homopolipeptidek vagy fehérjék vonatkozási spektrumaira, így sokkal közvetlenebb és általánosabban használható, bár az említett hozzárendelési nehézségek miatt az eredményeket kellő kritikával kell kezelni [68].

3.1. AZ FT-IR MÓDSZER FŐBB ALKALMAZÁSI TERÜLETEI

3.1.1. Membránfehérjék

Az FT-IR-spektroszkópia egyik legsikeresebb alkalmazási területe a membránfehérjék térszerkezetének vizsgálata. A membránfehérjék nem, vagy csak nagy nehézségek árán kristályosíthatók, így „kristálykonformációjuk” alig ismert. A kisebb-nagyobb membránfragmensek fényszórása eltorzíthatja a CD-spektrumokat, ami megnehezíti a kiroptikai spektroszkópiai vizsgálatokat is. Az is kérdéses, hogy a vizes pufferoldatokban mért vonatkozási CD-spektrumok alkalmazhatók-e a membránfehérjék hidrofób környezetben kialakuló natív másodlagos szerkezetének tanulmányozásánál. Az FT-IR-spektroszkópia viszont jól használható a természetes és mesterséges membránok, liposzómák és általában a micelláris rendszerek esetében. A membránt felépítő foszfolipid-molekulák többségében nem található az amid I ($1700\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$ -es)



3.2. ábra. Az apocitokrom c IR-spektrumának amid I tartománya vizes oldatban (1) és dimiriztoil-foszfatidil-glicerin micellák jelenlétében, lipid/fehérje arány 100 : 1 (2) és 20 : 1 (3). A, mért spektrumok; B, a spektrumok FSD sávszélesség javítás után, $K=1,8$

infravörös tartományban abszorbeáló csoportok. Egyedül a szfin-
golipidek amidcsoportjának és a foszfatidil-szerin karboxilcsoport-
jának elnyelése zavarhat. Ennek tulajdonítható, hogy a membrán-
fehérjékkel kapcsolatos munkák során gyakran használnak szintetikus
foszfolipidekből (pl. kizárólag palmitinsavat vagy egyéb zsír-
savat tartalmazó foszfatidil-kolinból vagy foszfatidil-etanol-amin-
ból) felépített mesterséges membránokat (3.2. ábra). Van lehetőség
természetes membránokkal végzett kísérletekre is, ilyen esetekben
a fehérje-membrán komplex infravörös spektrumából kivonják a
membrán spektrumát.

A korai munkák közül a szarkoplazmatikus retikulumból származó Ca^{2+} -ATPáz [69—72], a bakteriorodopszin és rodopszin [69, 72—74], valamint a mielin fehérjéinek (lipofilin és bázikus mielin fehérje) vizsgálata [75—77] érdemel említést. Az első generációs készülékek kis felbontóképessége miatt a sávok erősen átfedtek egymással. A hozzárendelést a gyenge jel/zaj viszony is nehezítette. Ennek ellenére az eredmények biztatóak voltak. Kiderült többek között, hogy a membránfehérjéknek vannak β -redőzött réteg szakaszai [71], és ami még meglepőbb, a hőmérséklet emelésével nő a β -konformáció mennyisége [78]. Lehetőség nyílt a membránfehérjék konformációváltozásainak és hőstabilitásának, vala-

mint a lipid mátrix fluiditásának tanulmányozására is. A vizsgálatok alapján feltételezték, hogy a membránfehérjéknek lehet az α -hélixről különböző helikális szerkezete [79].

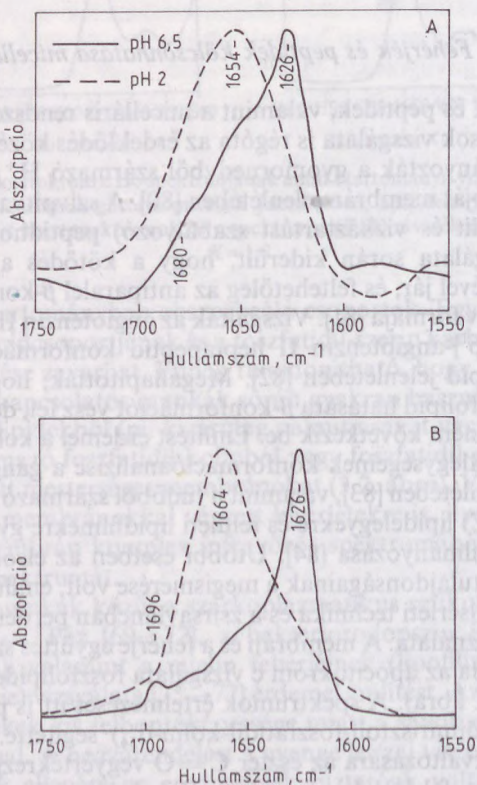
A korai vizsgálati eredményeket kellő kritikával kell kezelni. A membránfehérjék vizsgálata már az FT-IR-spektrométerek elterjedése előtt elkezdődött, és kezdetben az FT-IR készülékeken felvett spektrumok feldolgozása során sem alkalmaztak sáv szélesség-csökkentő módszereket. Ez érthető módon megnehezíti az eredmények összehasonlítását és értékelését.

3.1.2. Fehérjék és peptidek kölcsönhatása micellákkal

A fehérjék és peptidek, valamint a micelláris rendszerek közötti kölcsönhatások vizsgálata is régóta az érdeklődés középpontjában áll. Tanulmányozták a gyomornedvből származó H^+/K^+ -ATPáz konformációját membrán jelenlétében [80]. A szívpitvar nátriuretikus (elektrolit és víz háztartást szabályozó) peptidhormonjainak FT-IR vizsgálata során kiderült, hogy a kötődés a peptidlánc β -redőződésével jár, és feltehetőleg az antiparalel β -konformáció a hormon aktív formája [81]. Vizsgálták az angiotenzin II oktapeptid és a dez[Asp¹]-angiotenzin II heptapeptid konformációját savanyú foszfolipid jelenlétében [82]. Megállapították, hogy az oktapeptid a foszfolipid hatására β -konformációt vesz fel, de a csonkolt peptidnél ez nem következik be. Említést érdemel a kolera toxin A és B peptid-alegységeinek konformációanalízise a gangliozid G_{M1} receptor jelenlétében [83], valamint a tüdőből származó felületaktív fehérje (SP-C) lipidegyekre és felületi lipid filmekre gyakorolt hatásának tanulmányozása [84]. Utóbbi esetben az elsődleges cél a lipid felületi tulajdonságainak a megismerése volt, említést érdemel a szellemes kísérleti technika és a zsírsavláncban perdeuterált foszfolipidek használata. A membrán és a fehérje együttes szerkezetváltozására példa az apocitokrom c vizsgálata foszfolipidek jelenlétében [85] (3.2. ábra). A spektrumok értelmezését itt is perdeuterált foszfolipid (dimirisztoil-foszfatidil-kolin-d₅₄) segítette. A membrán szerkezetváltozására az észter C=O vegyértékrezgés ($>1700\text{ cm}^{-1}$), míg a fehérje konformációváltozására az amid I tartományban észlelt változásokból következtek a szerzők.

A fenti — korántsem teljes — összeállítás egy fontos tanulsággal szolgál. A membránnal való kölcsönhatás során a fehérje vagy

peptid másodlagos szerkezete gyakran a β -redőzött réteg konformáció irányába tolódik el, ami maga után vonhatja a láncok aggregálódását is [85]. Ez a hatás oktil-glikozid (OG) micellák jelenlétében is megfigyelhető. Az influenzavírus hemagglutinin hasadási helyét modellező peptidek [86], valamint az Alzheimer-kór kifejlődésében fontos szerepet játszó, 42 aminosavból felépített polipeptid (amiloid vagy A4 peptid) [87] OG micellák jelenlétében jellegzetes, β -szerkezet kialakulására utaló konformációváltozást szenved (3.3. ábra). A vizsgálatok egyértelműen igazolták, hogy ez



3.3. ábra. (A) a des[Ala^{21,30}]A42 amiloid peptidfragmens FT-IR spektrumának amid I tartománya D₂O-ban, pH=2 (-----) és pH=6,5 (————). (B) a fenti amiloid fragmens FT-IR spektruma vízben (D₂O, pH=6,5) oktil-glükozid micellák jelenlétében (2,5%), (————), valamint DMSO-ban (-----)

a folyamat micellák jelenlétét igényli, vagyis a kritikus micella-koncentráció alatt nem következik be. Az amiloid peptid esetében a konformációváltozást és azt követő aggregálódást az idegsejt membránjának károsodása válthatja ki. Az amiloid peptid kiszabadul természetes membránkörnyezetéből, és aggregálódása vezet végső soron az idegsejtek degenerálódásáért nagyrészt felelős plakkok (lepedékek) kialakulásához.

SCHWYZER és munkatársai részletesen vizsgálták az adrenokortikotropin és a dinorfin konformációs és topológiai viselkedését membrán mátrixban [88—90]. A nagy jelentőségű munka értékét egyedül az infravörös spektrumok kis felbontása csökkenti, mivel sávszélesség-csökkentő technikák alkalmazására nem került sor.

3.1.3. Fehérjék és peptidek oldatban kialakult konformációjának vizsgálata

A felbontást javító FT-IR technikák alkalmazásának egyik első példája a β -laktoglobulin *denaturációjának* vizsgálata lúg, illetve szerves oldószerek (metanol, izopropil-alkohol) hatására [91]. Az infravörös spektrum amid I tartományának tanulmányozása alapján a szerzők három különböző denaturált formát különböztettek meg. A kapott spektrumokra mindhárom esetben a nagy sávszélesség volt jellemző, a sávok maximuma 1640, illetve 1647 cm^{-1} táján volt, de alkoholok jelenlétében kisebb-nagyobb intenzitással jelentkeztek viszonylag éles sávok 1685 és $\sim 1615 \text{ cm}^{-1}$ -nél is. Hasonló vizsgálatokat végeztek a kimotripszin és a konkanavalin A fehérjékkel is, ott egyetlen denaturált formára utaló amid I sávot észleltek csak.

Szerves oldószerek hatását fehérjefilmeken kezdték el tanulmányozni [91, 92]. A fehérjék rosszul oldódnak a legtöbb szerves oldószerben, ezért úgy jártak el, hogy germániumkristályra felvitt fehérjefilmeket szerves oldószerekkel kezeltek, és a szolvatált filmek gyengített teljes reflexiós infravörös spektrumát mérték [92]. Kiderült, hogy míg különböző oldószerek, így a metanol és etilén-glikol egy adott fehérjénél kiválthatnak azonos hatást (pl. az albumin esetében növelhetik az α -hélix tartalmát), addig más fehérjék-nél (pl. immunoglobulin G) előidézhethetnek ellentétes spektrális változásokat is.

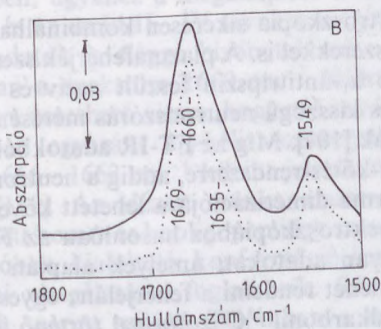
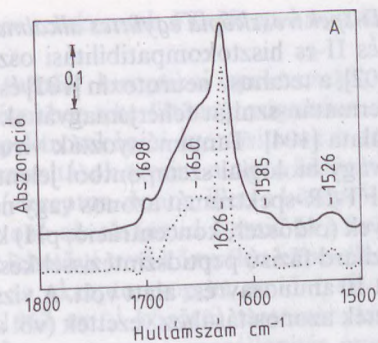
MANTSCH és munkatársai részletesen vizsgálták a dimetil-szulfoxid (DMSO) [93] és a trifluor-etanol (TFE) [94] hatását. Mindkét

oldószer viszonylag jól oldja a fehérjéket, a DMSO az NMR, míg a TFE a CD-spektroszkópiában gyakran használt oldószer. Kiderült, hogy a DMSO jelentős destabilizáló hatást gyakorol a natív (pl. helikális) térszerkezetre: a szerkezet fellazulását gyakran intermolekuláris β -redőzött réteg képződés és aggregálódás (sáv 1621 cm^{-1} -nél) követi. Megfigyelték a hőstabilitás csökkenését is. D_2O -DMSO elegyekben végzett mérések azt mutatták, hogy a DMSO szétrombolja a D_2O -ban kialakuló és az aperiodikus formára jellemző $\text{D}\cdots\text{O}=\text{C}$ kötéseket is. A DMSO arányának növelésével az 1645 cm^{-1} -es sáv intenzitása fokozatosan csökken és az $1663\pm 1\text{ cm}^{-1}$ -nél növekvő intenzitással megjelenő sáv a szabad amid $\text{C}=\text{O}$ csoportok uralkodóvá válását tükrözi (3.3. ábra).

A halogénezett alkoholok hélixindukáló hatása régóta ismeretes. A TFE és a hexafluor-izopropil-alkohol (HFIP) közkedvelt oldószerek a CD-spektroszkópiában, oldóhatásuk kiváló és elnyelésük kb. 185 nm -ig nem jelentős. D_2O -alkohol elegyekben végzett szisztematikus FT-IR-spektroszkópiai vizsgálatok szerint [94] a „helikogenezist” kiváltó hatás a diklór-etanol > bróm-etanol > trifluor-etanol > klór-etanol > fluor-etanol sorrendben csökken. A vizsgált alkoholokban a konkanavalin A (egy tipikus β -fehérje) β -redőzött konformációja túlnyomóan helikálissá változik (sáv 1650 cm^{-1} fölött). Az egyes oldószerekre jellemző kritikus koncentráció alatt a hőstabilitás csökkenését és aggregálódást figyeltek meg. A szerzők a halogénezett alkoholok hatását a kis dielektromos állandóra és nagy dipólusmomentumra vezették vissza [94]. Az utóbbi destabilizálja a belső H-kötéseket, míg az előbbi elősegíti a fehérjelánc hélixhez vezető konformációs átmenetét (refolding) (3.4. ábra).

Az FT-IR-spektroszkópiában alkalmazható speciális technika a nagy nyomáson ($\leq 60\text{ kbar}$) történő mérés, illetve a spektrumok nyomásfüggésének vizsgálata [95]. A hidrosztatikus nyomás növelése lényegében olyan hatást gyakorol a molekulákra, mint a hőmérséklet csökkentése, ezért a módszer jól használható konformációs átalakulások és aggregálódási folyamatok tanulmányozására.

Korán felismerték, hogy az FT-IR-spektroszkópia használható *fémionok hatására bekövetkező konformációváltozások* tanulmányozására is. A kék színű réztartalmú fehérje, az azurin és a rézmentes apoazurin spektruma szobahőmérsékleten nem különbözik egymástól [96], de az apoazurin hődenaturációra érzékenyebb. A



3.4. ábra. Az influenzavírus hemagglutinin alegységeket áthidaló (intersubunit) 25 tagszámú fragmensének IR-spektruma D_2O -oldatban (A) és TFE-ben (B). A szaggatott vonallal rajzolt görbék az FSD spektrumok, $K=1,75$

kalmodulin és parvalbumin Ca^{2+} -kötő fehérjék FT-IR vizsgálata azt mutatta, hogy Ca^{2+} -ionok jelenlétében valamelyest nő az α -hélix tartalom, de figyelemre méltóbb, hogy lényegesen nagyobb a fehérjék hőstabilitása [97]. Az említett munka nem támasztotta alá azt a nézetet, miszerint a kalmodulinban és a troponin C-ben valamilyen torzult α -hélix fordulna elő [98]. Vizsgálták a konkavalin A Mn^{2+} -ionok eltávolítását követő konformációváltozást is [99]. Meglepőnek számít az a megfigyelés, hogy az idegsejtek neurofilament fehérjéinek foszforilezett fragmenséi TFE-oldatban Ca^{2+} -ionok jelenlétében β -redőzött réteg konformációt vesznek fel [100]. A fehérjék fémionkomplexeinek FT-IR-spektroszkópiai viselkedését részletesen tárgyalja egy 1989-ben megjelent összefoglaló munka [101].

Az FT-IR- és CD-spektroszkópia együttes alkalmazására példa a szolubilizált, I-es és II-es hisztokompatibilitási osztályba tartozó antigén fehérjék [102], a tetanusz neurotoxin [103] és a sertésbőrből származó proteodermatán-szulfát fehérjemagvának (core protein) konformációvizsgálata [104]. Tanulmányozták vírusfehérjék antigén tulajdonságú vagy biológiai szempontból jelentős peptidfragmenseinek CD- és FT-IR-spektrumát azonos vagy nagyon hasonló kísérleti körülmények (oldószer, koncentráció, pH) között [86, 105, 106]. A peptidek szilárd fázisú peptidszintézissel készültek, tagszámuk 30, esetenként 10 aminosavrész alatt volt. A vizsgálatok gyakran β -turn szerkezetek azonosításához vezettek (vö. a 3.1.4. fejezettel).

Az FT-IR-spektroszkópia sikeresen kombinálható más szerkezetvizsgálati módszerekkel is. A plazmafehérjék szerpin szupercsaládjába sorolható α_1 -antitripszin feszült natív és elhasadt aktív formáját FT-IR és kisszőgű neutronszórás mérésén alapuló módszerekkel vizsgálták [107]. Míg az FT-IR adatokból a másodlagos szerkezetre és a H-kötés-rendszerre, addig a neutronszórás vizsgálatából a natív forma dimerizációjára lehetett következtetni.

A kiroptikai spektroszkópiához hasonlóan az FT-IR módszer sem szolgáltat olyan adatokat, amelyek alapján a másodlagos szerkezetet hozzá lehet rendelni a fehérjelánc egyes szakaszaihoz. Ezen segít az amidkarbonil ^{13}C -izotóppal történő jelölése. A $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ csere átlagosan 37 cm^{-1} -gyel csökkenti egy izolált karbonil-oscillátor vegyértékrezgésének frekvenciáját. Így — megfelelő helyen történő ^{13}C -izotóp beépítésével — az azonosított másodlagos szerkezet egyértelműen hozzárendelhető valamelyik peptidszakaszhoz. Az izotópos módszer teljesítőképességét megfelelően választott és [^{13}C -1]alanin- és [^{13}C -1]glicin-részeket tartalmazó modellpeptideken vizsgálták:

AEAEAAAAAEAEWEGEGGGGGEGEG

(a jelölés a folytonos, illetve szaggatott vonallal aláhúzott aminosavrészekben történt) [108].

3.1.4. A β -turn szerkezetek FT-IR-spektroszkópiai azonosítása

Ahogy a β -turnök kiroptikai spektroszkópiai tulajdonságait csak az elmúlt években sikerült megnyugtatóan tisztázni, úgy sokáig infravörös spektroszkópiai azonosításuk is nehézségekbe ütközött. Elméleti számítások szerint nincs a különböző β -turn típusok adott helyzetű (akceptor, donor, illetve középső) amidcsoportjai és a hozzájuk tartozó sávok (amid I-amid IV) frekvenciája között a hozzárendelést lehetővé tevő közvetlen kapcsolat. LAGANT számításai szerint pl. az akceptorcsoport amid I sávjának frekvenciája széles (1641—1667 cm^{-1} közötti) tartományban változik a turn típusától függően, ugyanez a megállapítás érvényes a másik két amidcsoportra és az amid II—IV sávokra is [109].

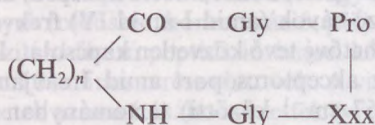
A kísérleti adatok is eléggé bizonytalanok voltak, a „ β -turn sávot” általában a spektrum 1660 cm^{-1} fölötti tartományában keresték. Ez arra vezethető vissza, hogy néhány kristályos állapotban és oldatban egyaránt 3_{10} -hélix szerkezetű modellvegyület amid I sávja 1666—1662 cm^{-1} között jelenik meg az infravörös spektrumban [110]. Az idézett munka amino-izovajsavat (Aib) tartalmazó védett homo- és kooligopeptidek szerves oldószerben és lipid diszperzióban kialakuló konformációjának összehasonlító spektroszkópiai vizsgálatával foglalkozik. Röntgenkristallográfiai vizsgálatok szerint szilárd állapotban a modellpeptideknek ideális 3_{10} -hélix (ismétlődő III-as β -turn) szerkezete van. Az is régóta ismeretes, hogy az Aib-peptidek gyakran képeznek 3_{10} -hélixet [111, 112]. 3_{10} -hélix közönséges fehérjealkotó aminosavakból is kialakulhat és vízoldható fehérjékben is gyakori, elsősorban α -hélixek kezdeti és zárószakaszként [113].

A poli(Aib) 3_{10} -hélix infravörös spektrumában az amid I sáv elméleti számítások szerint 1665 cm^{-1} -nél, míg a III-as típusú β -turnében 1686 és 1646 ± 3 cm^{-1} -nél várható [114]. Az alametecin szinképében a 3_{10} és α -hélix kombinált abszorpciós sávja 1663 cm^{-1} -nél jelentkezik, de egy gyengébb sáv 1639 cm^{-1} -nél ugyancsak a 3_{10} -hélixhez rendelhető [115].

Az 1639 cm^{-1} táján jelentkező amid I sáv és a 3_{10} -hélix közötti kapcsolatra utal a citokróm b_5 amfipatikus integrális membránfehérje [116], az α -laktalbumin [117] és alaninban gazdag oligopeptidek FT-IR-spektroszkópiai vizsgálata [118]. Az α -laktalbumin esetében a 3_{10} -hélix jelenlétét a szilárd állapotban kialakuló konformáció röntgenkristallográfiai vizsgálata támasztja alá

[119]. Az alanin-peptidek esetében a nitroxiddal kétszeresen jelölt (biradikális) forma ESR-spektroszkópiái vizsgálata alapján lehet az α -hélix helyett a 3_{10} -hélix kialakulását valószínűsíteni [118].

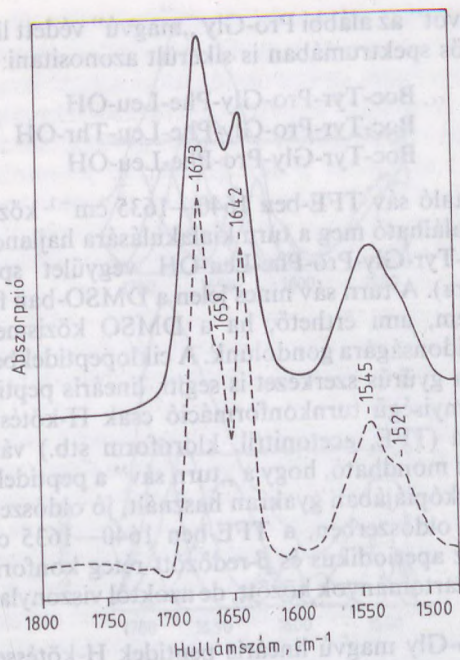
Az FT-IR-spektroszkópiával jellemzett β -turn modellvegyületek közül feltétlenül említést érdemelnek az alábbi, áthidalt gyűrűs szerkezetű peptidek [40, 41]:



Xxx = Gly, Ser(O^tBu), Ser, Thr(O^tBu), $n = 2, 4$

Korábbi CD, ¹H és ¹³C NMR-spektroszkópiái vizsgálatok szerint a Pro-Gly modellekben oldatban két ($n=4$), illetve egy ($n=2$) II-es típusú β -turn, míg a Pro-Ser(O^tBu) és Pro-Ser kváziciklohexapeptidekben ($n=4$) két I-es β -turn alakul ki [40]. A Pro-Ser(O^tBu) ciklopeptid szilárd állapotban kialakuló I-es β -turn konformációját röntgendiffrakciós vizsgálatok is alátámasztják [41]. (Az I-es és II-es családba tartozó β -turnök konformációs egyensúlyáról lásd a 4.1.3.2. fejezetet.) A kváziciklopeptidek ($n=4$) makrogyűrűjének tagszáma 18, ugyanúgy, mint a közönséges ciklohexapeptideké. Jól ismert, hogy a 18-as gyűrűtagszámú ciklohexapeptidek hajlamosak két H-kötéssel stabilizált β -turn képzésére [120]. Az áthidalt gyűrűs modellvegyületekben 6 amidkarbonil helyett csak 5 található, és az amid NH-csoportok száma a prolin jelenléte miatt mindössze 4. Ezek a szerkezeti adottságok, valamint a különböző oldószerekben felvett FT-IR-spektrumok amid A, amid I és amid II tartományának összehasonlító vizsgálata nagy segítséget jelentett a különböző helyzetű amidcsoportok és az amid I sávok közötti kapcsolat megteremtésében [121, 122].

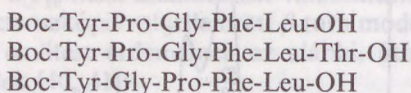
A szerves oldószerekben mért spektrumok amid I tartományában két sáv található, az egyik 1680—1665 cm^{-1} , a másik 1646—1635 cm^{-1} között (3.5. ábra). Az 1660 cm^{-1} fölötti sáv nagyobb intenzitása, valamint oldószereltolódása alapján a szolvatált, de intramolekuláris H-kötést nem képező amidkarbonilokhoz, míg a kisebb frekvenciájú sáv az 1←4 H-kötések akceptor karbonilcsoportjához rendelhető. Halogénezett alkoholokban (klóretanol, TFE) mindkét sáv kisebb frekvenciáknál (1667, illetve 1635



3.5. ábra. A ciklo[Gly-Pro-Gly-Gly-NH-(CH₂)₄-CO] ciklopeptid FT-IR-spektruma DMSO-oldatban (amid I és II tartomány, a szaggatott vonal az FSD-spektrumot jelöli)

cm⁻¹-nél) jelentkezik. Nehézzvízben a nagyobb intenzitású sáv továbbí hullámszámcsökkenést szenved: 1655 ± 1 cm⁻¹-nél található a spektrumban. A jelentős eltolódás részben a hatékony solvátációnak, részben pedig az NH → ND cserének tulajdonítható. (Vízben ez a sáv 1661 ± 1 cm⁻¹-nél jelenik meg.) A „turn sáv” helyzete nehézzvízben 1640 ± 1 cm⁻¹. A nehézzvízben és vízben felvett spektrumok jellegzetessége egy 1621 ± 1, illetve 1623 ± 1 cm⁻¹-nél felbukkanó, kis sávszélességű komponens. Annak alapján, hogy más ciklopeptidek D₂O-ban (illetve H₂O-ban) mért spektrumában is megjelenik [123] ez a sáv, egyértelműen a víz jelenlétével és a gyűrűs szerkezettel hozható összefüggésbe. Valószínű, hogy a sáv szerkezeti (vagy „komplexált”) vízzel kialakuló bifurkált H-kötéseket képező C=O-csoport(ok)hoz tartozik.

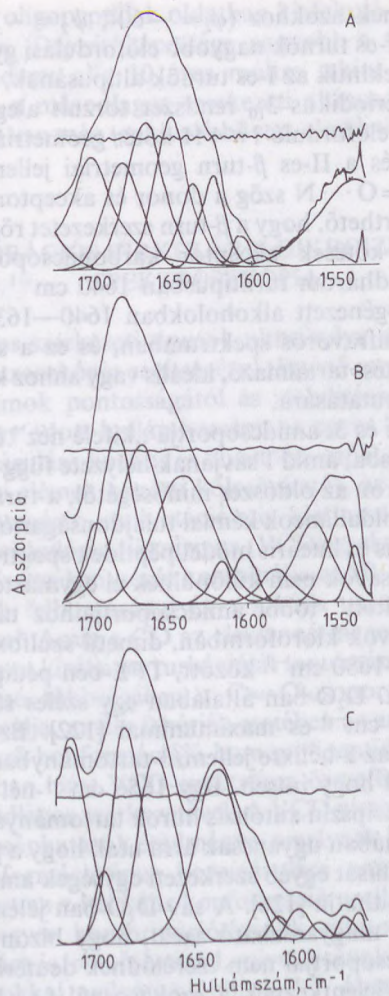
A „turn sávot” az alábbi Pro-Gly „magvú” védett lineáris peptid-
dek infravörös spektrumában is sikerült azonosítani:



A β -turnre utaló sáv TFE-ben $1640\text{--}1635\text{ cm}^{-1}$ között jelentkezik, de nem található meg a turn kialakulására hajlandóságot nem mutató Boc-Tyr-Gly-Pro-Phe-Leu-OH vegyület spektrumában [124] (3.6. ábra). A turn sáv nincs jelen a DMSO-ban felvett spektrumokban sem, ami érthető, ha a DMSO közismert H-kötéscsökkentő tulajdonságára gondolunk. A ciklopeptidekben a H-kötés kialakulását a gyűrűs szerkezet is segíti, lineáris peptidekben számottevő mennyiségű turnkonformáció csak H-kötést stabilizáló oldószerekben (TFE, acetonitril, kloroform stb.) várható [125]. Szerencsésnek mondható, hogy a „turn sáv” a peptid- és fehérjék CD-spektroszkópiájában gyakran használt, jó oldószerhatású, hélix-stabilizáló oldószerben, a TFE-ben $1640\text{--}1635\text{ cm}^{-1}$ között jelentkezik, az aperiodikus és β -redőzött réteg konformációra jellemző amid I tartományok között, de azoktól viszonylag jól elkülönülve.

A fenti Pro-Gly magvú lineáris peptid-
dek H-kötéssel stabilizált β -turn szerkezetét ^1H és ^{13}C NMR vizsgálatok is alátámasztották [125]. A várakozásnak megfelelően az uralkodó β -turn konformer populáció II-es típusú, amit elsősorban a $\text{C}^\alpha\text{H}(\text{Pro})$, $\text{NH}(\text{Gly})$ és $\text{CH}(\text{Gly})$ hidrogének térbeli közelségével magyarázható, jellegzetes NOE, illetve NOESY spektrumok támasztanak alá (vö. a 4.1.3. fejezettel).

A fenti, gyűrűs és nyílt láncú modellpeptideken végzett szisztematikus FT-IR spektroszkópiai vizsgálatok jó összhangban vannak azzal az egyre általánosabban elfogadottá váló nézettel, hogy a 3_{10} -hélix H-kötéseire vonatkozó sáv nem 1660 cm^{-1} fölött, hanem 1639 cm^{-1} táján található az infravörös spektrumban [116–119]. A 3_{10} -hélix periodikus szerkezetét ismétlődő $1\leftarrow 4$ (C_{10}) H-kötések rögzítik, és minden egyes triamid részlete egy III-as típusú β -turnnek felel meg. A 3_{10} -hélix torziószögei ($\varphi = -60^\circ$, $\psi = -30^\circ$) kétszer ismétlődnek meg a III-as β -turnben ($\varphi_{2,3} = -60^\circ$, $\psi_{2,3} = -30^\circ$). Ezek az értékek a 2. aminosav esetében azonosak az I-es β -turn torziószögeivel, a 3. aminosavnál



3.6. ábra. FT-IR-spektrumok amid I tartománya görbeillesztés után. Boc-Tyr-Gly-Pro-Phe-Leu-OH TFE-ben (A); Boc-Tyr-Pro-Gly-Phe-Leu-OH TFE-ben (B) és acetonitrilben (C). A β -turnre utaló sávkomponens különösen erős a C spektrumban

pedig közel esnek azokhoz ($\varphi_2 = -60^\circ$, $\psi_2 = -30^\circ$, $\psi_3 = -90^\circ$, $\varphi_3 = 0^\circ$) [8]. Az I-es turnök nagyobb előfordulási gyakorisága miatt a III-as típust tekintik az I-es turnök altípusának, de az I-es β -turn felfogható a periodikus 3_{10} rendszer torzult alegységeként is. A kétféle turnben előforduló $1 \leftarrow 4$ H-kötés geometriája alig különbözik egymástól és a II-es β -turn geometriai jellemzőitől (N \cdots O távolság és C=O \cdots N szög a donor és akceptor amidcsoportok között). Ezért érthető, hogy a β -turn szerkezetet rögzítő $1 \leftarrow 4$ intramolekuláris H-kötések akceptor karbonilcsoportjához tartozó amid I sáv mindhárom turntípusban 1640 cm^{-1} táján (erős proton donor halogénezett alkoholokban $1640\text{--}1635 \text{ cm}^{-1}$ között) jelentkezik az infravörös spektrumban, és ez a sáv („turn sáv”) jellemző a H-kötést tartalmazó, ideális vagy ahhoz közeli geometriájú β -turnök kimutatására.

A β -turnök 2. és 3. amidcsoportja „kifelé néz” és az oldószerrel lép kölcsönhatásba, amid I sávjának helyzete függ a *szolvatációtól*, vagyis végső soron az oldószer minőségétől, a turn geometriájától és az aminosav oldalláncok kémiai tulajdonságaitól és térigényétől. A vizsgált gyűrűs és lineáris modellpeptidek spektrumában a „nem akceptor” amidsávok nem különülnek el egymástól és a molekula „oldószernek kitett” többi amidcsoportjaihoz tartozó sávoktól. Ezek az amidsávok kloroformban, dimetil-szulfoxidban és acetonitrilben $1670\text{--}1680 \text{ cm}^{-1}$ között, TFE-ben pedig 1665 cm^{-1} táján jelentkeznek. D_2O -ban általában egy széles sávkontúr figyelhető meg 1655 cm^{-1} -es maximummal [122]. Ez utóbbi rezgési frekvenciaérték az α -hélixre jellemző tartományban található, ami óvatosságra kell hogy intsen. Egy 1656 cm^{-1} -nél jelentkező sávkomponens a β -tripszin autolízis hurok tartományának („autolysis loop”) spektrumában ugyancsak arra utal, hogy a peptidek α -hélix sávjának intenzitását egyéb szerkezeti egységek amidcsoportjainak elnyelése módosíthatja [126]. A sáv D_2O -ban jelentkezik (amid I' sáv) és helyzete magyarázható azzal, hogy bizonyos rendezetlen szakaszok NH-csoportjai nem cserélődnek deutériumra („buried-NH”), és azért jelentkeznek a szokásosnál ($\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$) nagyobb frekvenciaértéknél.

A „turn sávot” sikerült azonosítani a HIV gp120 glikoprotein glikozilezett peptidfragmenseinek [106] és az influenzavírus hemagglutinin fehérje hasadási tartományából származó peptidek [86] infravörös spektrumában is.

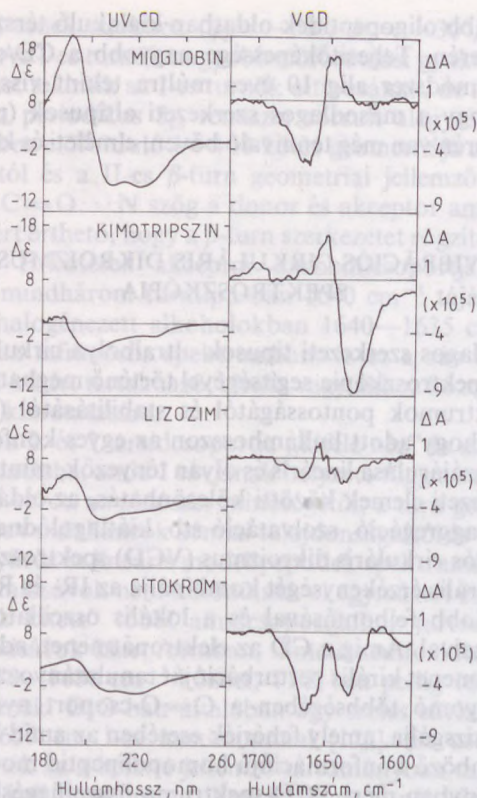
Az FT-IR-spektroszkópia ígéretes módszer a fehérjék és a rövi-

debb-hosszabb oligopeptidek oldatban kialakuló térszerkezetének vizsgálata terén. Teljesítőképessége nagyobb a CD-spektroszkópiáénál. A módszer alig 10 éves múltra tekint vissza, így nem meglepő, hogy a másodlagos szerkezeti altípusok (pl. γ -turnók) jellemzése terén van még tennivaló bőven, elméleti és kísérleti síkon egyaránt.

3.2. A VIBRÁCIÓS CIRKULÁRIS DIKROIZMUS (VCD) SPEKTROSKÓPIA

A másodlagos szerkezeti típusok ultraibolya cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia segítségével történő meghatározása függ a bázisspektrumok pontosságától és stabilitásától (2.4. fejezet). Feltételezi, hogy adott hullámhosszon az egyes konformációtípusok CD hozzájárulása lineáris és olyan tényezők, mint pl. a másodlagos szerkezeti elemek közötti kölcsönhatás, az oldalláncok hozzájárulása, aggregáció, solvatáció stb. kiátlagolódnak.

A vibrációs cirkuláris dikroizmus (VCD) spektroszkópia [127] a CD strukturális érzékenységét kombinálja az IR- és Raman-spektroszkópia jobb felbontásával és a lokális oszcillátorok előnyös tulajdonságaival. Amíg a CD az elektronátmenet, addig a VCD a vibrációs átmenet királis perturbációját tanulmányozza. A VCD az esetek túlnyomó többségében a C=O-csoport nyújtási rezgési átmenetét vizsgálja, amely fehérjék esetében az amid I sávnak felel meg. Különböző konformációjú homopolipeptid modellek amid I sáv tartományban mért VCD-spektruma összefüggésbe hozható a peptidek másodlagos szerkezetével. A VCD viszonylag rövid hatótávolságú kölcsönhatások eredménye, amelynek következtében valamennyi konformációtípus hozzájárulása nagyjából azonos (a CD-spektrumot az α -helikális konformáció uralja). A VCD-spektrometria az egyes konformációtípusok pontosabb, kvantitatív meghatározására is lehetőséget ad, mivel a sávok előjel- és frekvenciaváltozása sokkal nyilvánvalóbb. A 3.7. ábra néhány jellemző konformációjú fehérje amid csoportjának CD-spektrumát hasonlítja össze a megfelelő amid I átmenet VCD-spektrumával [127]. A CD-spektrumok nagyjából azonos lefutásúak, csak a sávok intenzitásváltozása utal a másodlagos szerkezetbeli különbségekre. Ugyanakkor a VCD-spektrumok drámai különbségeket mutatnak. Az α -helikális konformációjú mioglobinnal szemben a VCD-spektrumára egy negatív/



3.7. ábra. Különböző fehérjék ultraibolya CD és vibrációs (VCD) spektrumainak összehasonlítása

pozitív sávpár ($\nu_{\max} = 1666$ és 1650 cm^{-1}), a jórészt β -redőzött kimotripszinre viszont pozitív/negatív sávpár ($\nu_{\max} = 1652$ és 1633 cm^{-1}) jellemző. Ha ez a két fő szerkezeti típus egyetlen fehérjén belül kombinálódik, úgy a különböző lefutású sávok összegződése sokkomponensű VCD-spektrumot eredményez. A lizozim spektrumának legalább 3 sávja van 1655 ± 5 , 1651 ± 5 és $1637 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ -nél.

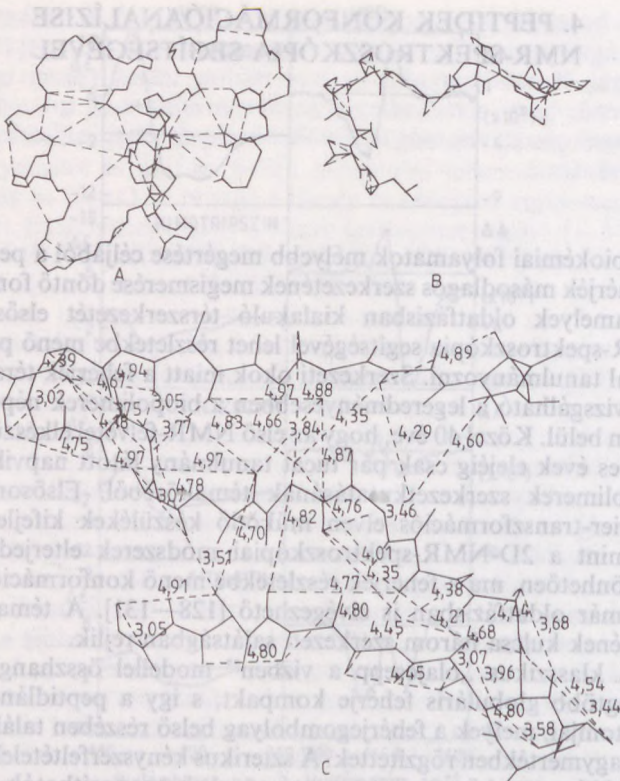
A VCD-spektrometria az említett előnyök ellenére sem terjedt el, ami a mérés technikai nehézségek mellett arra vezethető vissza, hogy VCD-készülékek még nincsenek kereskedelmi forgalomban.

4. PEPTIDEK KONFORMÁCIÓANALÍZISE NMR-SPEKTROSKÓPIA SEGÍTSÉGÉVEL

A biokémiai folyamatok mélyebb megértése céljából a peptidek és fehérjék másodlagos szerkezetének megismerése döntő fontosságú, amelyek oldatfázisban kialakuló térszerkezetét elsősorban NMR-spektroszkópia segítségével lehet részletekbe menő pontossággal tanulmányozni. Szerkezeti okok miatt a fehérjék térszerkezete vizsgálható a legeredményesebben a biopolimerek népes családján belül. Közel 40 éve, hogy az első NMR-felvétel elkészült, ám a 70-es évek elejéig csak pár tucat tanulmány látott napvilágot a biopolimerek szerkezetkutatásának témaköréből. Elsősorban a Fourier-transzformációs elven működő készülékek kifejlesztése, valamint a 2D-NMR-spektroszkópiai módszerek elterjedésének köszönhetően, ma a fehérjék részletekbe menő konformációanalízise már oldatfázisban is elvégezhető [128—131]. A tématerület sikerének kulcsa három szerkezeti sajáttságban rejlik.

- i. A klasszikus „olajcsepp a vízben” modellel összhangban, a legtöbb globuláris fehérje kompakt, s így a peptidlánc azon atomjai, melyek a fehérjegombolyag belső részében találhatóak, nagymértékben rögzítettek. A szterikus kényszerfeltételek miatt csökkentett hőmozgást mutató atomok azonosíthatók, s „rutin” eljárások segítségével a térben elhelyezhetőek.
- ii. A polipeptidlánc „felgombolyíthatóságából” adódóan sok szekvenciálisan távol eső atom térben közel kerülhet, s az így meghatározható számos, a polipeptidlánc aminosavszekvenciájára nézve specifikus (sztereo-specifikus) NOE távolságérték alkotja a konformációs peremfeltétel-rendszer alapjait.
- iii. A primer szekvenciában elkülönülő részek térbeli közelsége tipikus gerinc-gerinc, gerinc-oldallánc, valamint oldallánc-oldallánc kapcsolatokat eredményez, amelyek lecsökkentik a lehetséges térbeli elrendeződések számát (4.1. ábra.).

A közfelfogástól eltérően az NMR-spektroszkópia nem határozza meg közvetlenül a molekula térszerkezetét, hanem speciális pulzusszekvenciák alkalmazásával a molekulán belül található



4.1. ábra. (A) Egy globuláris fehérje gerinckonformációjának sematikus ábrája, ahol a térszerkezet-meghatározás pillérkövét képező „távoli” proton-proton távolságokat szaggatott vonallal jelöltük.

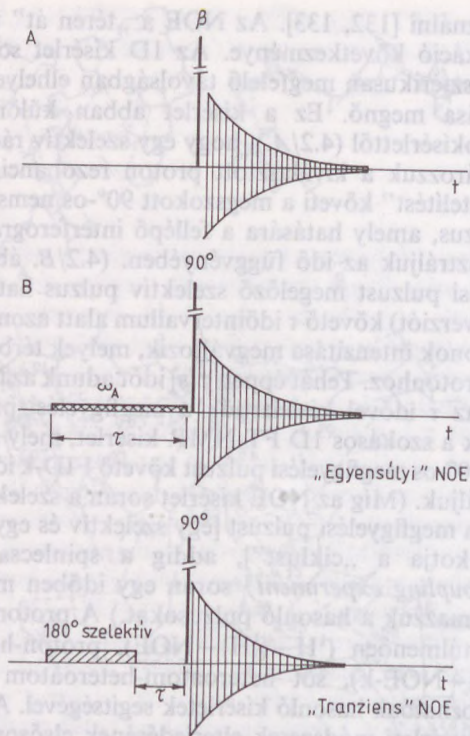
(B) Egy mozgékony peptid „időátlag” térszerkezete (az amidprotonok kivételével a hidrogénatomok nincsenek feltüntetve), mely esetben „távoli” proton-proton kapcsolatok nem azonosíthatók. (A szaggatott vonal a „rövid” proton-proton távolságadatokra utal)

(C) A CD4 fehérje D1 alegységének szekvenciárészelete (az NH és a H^α kivételével hidrogénatomok nincsenek feltüntetve), ahol az 5Å-nél rövidebb $d_{\alpha N}(i, j)$ és $d_{NN}(i, j)$ távolságokat tüntettük fel. (Emlékeztetőül, az 5Å-nél távolabb proton-proton távolságok NOE alapján nem határozhatók meg.)

„nemtriviális” atompárkapcsolatokról ad elsősorban felvilágosítást. A szekvenciában távol eső, ám térben mégis közeli atomok azonosítására legelterjedtebben NOE mérések eredményeit szok-

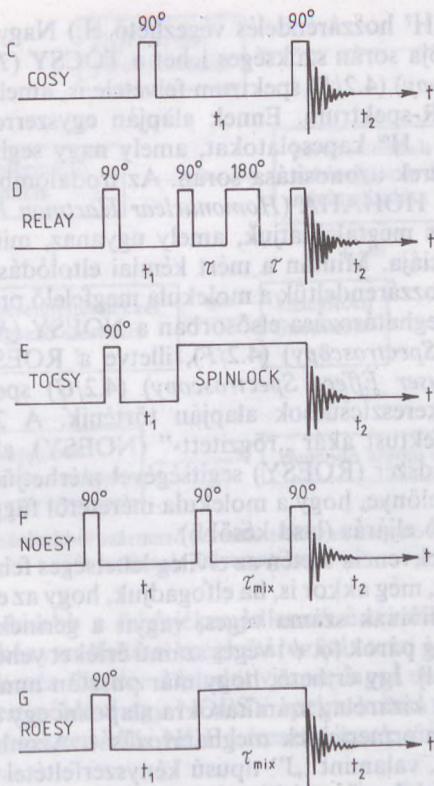
ták felhasználni [132, 133]. Az NOE a „térén át” történő dipol-dipol relaxáció következménye. Az 1D kísérlet során, a telített protontól szterikus megfelelő távolságban elhelyezkedő proton jelintenzitása megnő. Ez a kísérlet abban különbözik az ^1H NMR alapkísérlettől (4.2/A.), hogy egy szelektív rádiófrekvenciával besugározzuk a kiválasztott proton rezonanciajelét, majd a szelektív „telítést” követi a megszokott 90° -os nemszelektív „kiolvasó” pulzus, amely hatására a fellépő interferogramokat (FID-eket) regisztráljuk az idő függvényében. (4.2/B. ábra) A normál megfigyelési pulzust megelőző szelektív pulzus hatására létrejött telítést (inverziót) követő τ időintervallum alatt azon kémiai eltolódású protonok intenzitása megváltozik, melyek térben közel esnek a telített protonhoz. Tehát éppen τ [s] időt adunk az NOE kifejlődésének, azaz τ idővel késleltetjük a megfigyelési pulzust. Ezután következik a szokásos 1D FT-NMR kísérlet, mely során egy nem szelektív 90° -os megfigyelési pulzust követő FID-k időbeli lecsengését analizáljuk. (Míg az NOE kísérlet során a szelektív besugárzás megelőzi a megfigyelési pulzust [egy szelektív és egy nem szelektív pulzus alkotja a „ciklust”], addig a spinlecsatolási kísérlet (*spin decoupling experiment*) során egy időben megosztott módon alkalmazzuk a hasonló pulzusokat.) A proton-proton távolságokon túlmenően ($^1\text{H}-\{^1\text{H}\}$ -NOE), proton-heteroatom (pl. $^1\text{H}-\{^{13}\text{C}\}$ -NOE-k), sőt heteroatom-heteroatom távolságok is meghatározhatóak hasonló kísérletek segítségével. A heteronukleáris-NOE kísérleti módszerek elterjedésének elsősorban az NMR-aktív izotópok (pl. ^{13}C) kismértékű természetes előfordulása szabgátat. Az így meghatározott nemkovalens távolságok, valamint a gerinckonformáció torziószögértékeire utaló csatolási állandók (J) szolgáltatják a szerkezeti peremfeltételek döntő hányadát.

A szerkezettanulmányozás során hamar kiderült, hogy az egyetlen változó függvényében vizsgált NMR-spektrumok nem alkalmasak a biopolimerek bonyolult szerkezetének felderítésére, még a legnagyobb sztatikus mágneses teret biztosító készülékek esetében sem. Az FT-technika bevezetésével ugrásszerűen megnőtt az összegyűjthető és feldolgozható adatok nagysága, és így hamarosan kidolgozták a több változó függvényében mérhető NMR-spektroszkópia alapjait. Az 1D NMR felvétel során a nem-szelektív rádiófrekvenciás (rf) pulzust követő interferogramot (FID-et) a t_2 -nek nevezett mérési időszakaszban (t_2 detection period) rögzít-



4.2. ábra. (A) 1D FT-NMR kísérlet, mely során egy nem szelektív β (vagy 90° -os) megfigyelési pulzust követő FID-k időbeli lecsengését analizáljuk. (B) Egy egyensúlyi és egytranziens NOE, mely hasonlít az FT-NMR alapkísérlethez, ám a megfigyelési 90° pulzus előtt τ idővel egy szelektív 180° -os pulzust is alkalmazunk. A COSY (Correlated Spectroscopy)

jük. A 2D NMR-spektroszkópia során mindezt megelőzi legalább egyetlen további rf pulzus, amelyet követ egy t_1 „kifejlődési időszaksz” (evolution time). Ha tehát ezt a kísérletet megismételjük változó t_1 értékek mentén, akkor egy $s(t_1, t_2)$ adatmátrixot állíthatunk elő, amely kétdimenziós Fourier-transzformálása során megkaphatjuk a kívánt $s(\omega_1, \omega_2)$ 2D frekvencia spektrumot. A legismertebb ilyen $s(\omega_1, \omega_2)$ spektrumtípusok a COSY (Correlated Spectroscopy) (4.2/C) korreált NMR-spektrum, illetve RELAY (Relayed coherence transfer experiment) vagy RELAYED-COSY



4.2. ábra. (C), a RELAY (*Relayed coherence transfer experiment*) (D), a TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) vagy HOHAHA (*Homonuclear Hartman Hahn spectroscopy*) (E), a NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) (F) és a ROESY (*Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy*) (G) legelterjedtebb 2D FT-NMR pulzusszekvenciák.

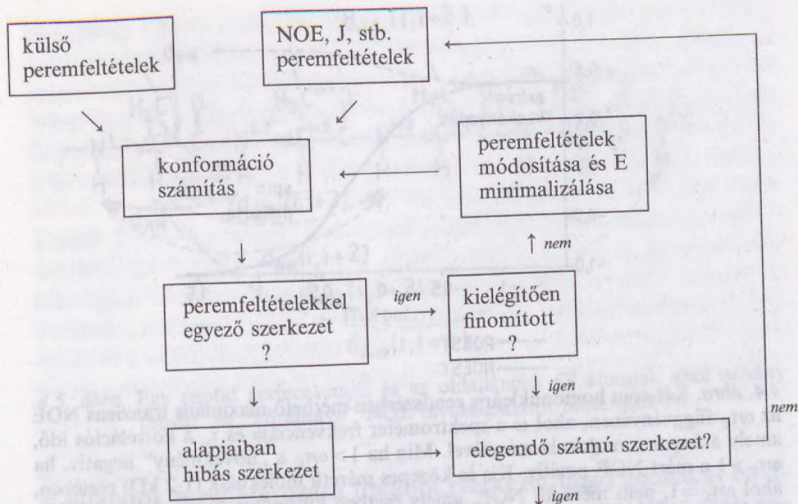
(4.2/D), amely egy módosított COSY-típusú pulzusszekvencia. Ennek során nemcsak a közvetlenül spin-spin kölcsönhatásban lévő protonok (J_{AB} vagy J_{BC}) csatolása figyelhető meg COSY keresztcsúcsok formájában, hanem az úgynevezett RELAY keresztcsúcsok is, amelyek a három kovalens kötésnél távolabbi protonok kapcsolatát fedhetik fel. (Egy aminosav H^{α} , H^{β} kapcsolata kiolvasható a COSY spektrumból, míg az egyszeres RELAY spektrum

alapján a H^α , H^γ hozzárendelés végezhető el.) Nagyobb molekulák asszignációja során szükséges lehet a TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) (4.2/E) spektrum felvétele is, amely egy teljesen korrelált NMR-spektrum. Ennek alapján egyszerre láthatjuk a H^α , H^β , H^γ ... H^ω kapcsolatokat, amely nagy segítség lehet át-fedő jelrendszerek azonosítása során. Az irodalomban ezt a pulzusszekvenciát HOHAHA (*Homonuclear Hartman Hahn spectroscopy*) néven is megtalálhatjuk, amely ugyanaz, mint a TOCSY pulzusszekvenciája. Miután a mért kémiai eltolódásokat részben vagy teljesen hozzárendeltük a molekula megfelelő protonjaihoz, a térszerkezet meghatározása elsősorban a NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) (4.2/F), illetve a ROESY (*Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy*) (4.2/G) spektrumokban azonosítható keresztcsúcsok alapján történik. A 2D nukleáris Overhauser effektust akár „rögzített-” (NOESY), akár „forgó”-koordináta-rendszer (ROESY) segítségével mérhetjük. Az utóbbi módszer nagy előnye, hogy a molekula méretétől függetlenül mindig használható eljárás (lásd később).

Egy adott szekvencia esetén az elvileg lehetséges fehérjeszerkezetek száma nagy, még akkor is, ha elfogadjuk, hogy az elemi alegységek konformációinak száma véges, vagyis a gerinckonformációt leíró torziósszög párok $\{\varphi, \psi\}$ véges számú értéket vehetnek csak fel [vö. 6. fejezettel]. Így érthető, hogy már pusztán numerikus okok miatt sem lehet kizárólag számításokra alapozni egy fehérje lehetséges gerinckonformerjeinek meghatározását. Azonban elegendő számú „NOE”, valamint „J” típusú kényszerfeltétel esetén, amelyek leszűkítik a konformációs lehetőségek számát, az oldatban kialakuló konformáció-családok feltérképezhetővé válhatnak. Az iteratív eljárás mindvégig a mérésekből származó atomtávolság és torziósszög jellegű kényszerfeltételek (NOE és J kényszerfeltételek), valamint a számított térszerkezeti paraméterek (távolságok és torziósszögeértékek) összehangolását célozza [134—137]. A számítás kezdeti stádiumában az aminosavak tipikus kötéshossz- és kötésszögadatait (külső peremfeltétel) használják, míg a torziósszögek megválasztása általában önkényes (4.3. ábra).

Míg a polipeptid lánchosszúságának csökkenésével a kémiai eltolódások hozzárendelése (*asszignációja*) a különböző helyzetű protonokhoz egyszerűsödik, addig a méretváltozás más jellegű szerkezetmeghatározási problémák forrása [131].

i. A rövidebb polipeptidlánc hajtogatottsága, valamint kompakt-



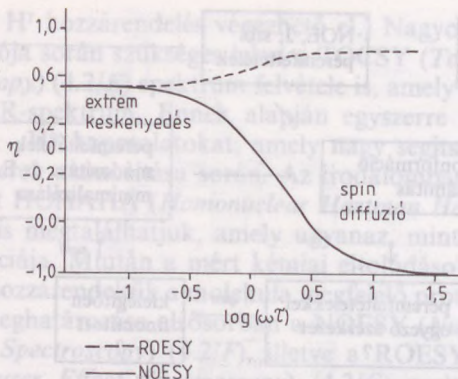
4.3. ábra. NMR-mérésekből származó peremfeltételeken alapuló konformáció meghatározás folyamatábrája

sága jóval kisebb a fehérjékre jellemző értéknél, ez kevesebb szerkezeti kényszerfeltétel meghatározását teszi lehetővé. Így a méretcsökkenés ellenére a feladat viszonylagos megoldhatósága romlik, mert például egy NOESY spektrumban a nélkülözhetetlen nem-szekvenciális NOE keresztcsúcsok száma lecsökken (4.1. ábra).

ii. Az időben kiátlagolódtott szerkezetben a távoli kölcsönhatások gyakran a megnövekedett mozgékonyaság következtében teljesen eltűnhetnek.

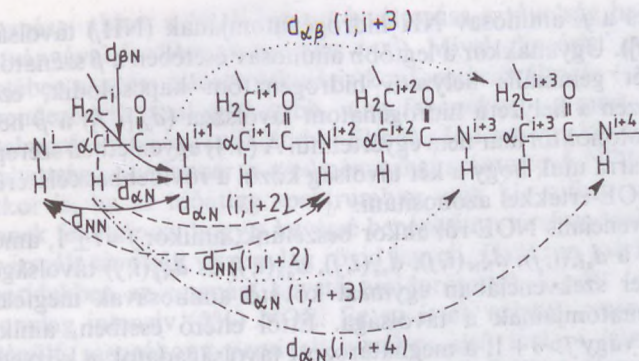
iii. Egy adott mérethatár alatt konformációs rögzítettség gyakorlatilag már nem észlelhető. Ezt a nehézséget tovább fokozza az, hogy bizonyos molekuláris mérettartományban egy adott térerősségű spektrométeren NOE-k elvi okok miatt sem mérhetők (4.4. ábra).

A kedvező szekvenciális vagy környezeti hatások miatt már egy rövidebb polipeptid térszerkezete is sztatikus jelleget mutathat, és ekkor a konformáció meghatározhatóvá válhat a fehérjékre kidolgozott eljárások segítségével. Ilyen környezettől kevésbé függő konformációjú fragmens például a miogloblin H-hélice [138] vagy a ribonukleáz S N-terminálisán elhelyezkedő 20 aminosavból álló



4.4. ábra. Két-spin homonukleáris rendszerben mérhető maximális tranziens NOE az $\omega\tau_c$ függvényében, ahol ω a spektrométer frekvenciája és τ_c a korrelációs idő, amely arányos a molekula méretével. Míg ha $1 > \omega\tau_c$ a „növekmény” negatív, ha $\omega\tau_c > 1$ a mért NOE pozitív. Kis és közepes méretű molekulák (1-2 kD) esetében, ahol $\omega\tau_c \approx 1$, nem mérhető NOE, amely esetben különösen fontos lehet a ROESY felvétel elkészítése. Míg az „extrém keskenyedés” (*extrem narrowing*) tartományban az $\text{NOE}_{\max} = 50\%$, addig a „spin diffúzió” (*spin diffusion*) tartományban az $\text{NOE}_{\max} = 100\%$

peptidszakasz. Az esetek döntő többségében azonban egy nem túl nagy fehérje adott hosszúságú darabjának a konformációmeghatározása jóval egyszerűbb feladat, mint az azonos méretű és szekvenciájú peptid térszerkezet-vizsgálata. Ha tehát egy fehérjefragmenst kiemelünk természetes környezetéből, úgy néhány esetet kivéve a molekula elveszíti a natív állapotra jellemző konformációs rögzítettségét. Ezért a szintetizált peptidok esetében különösen nagy jelentősége van a molekulába „beépített” speciális kényszerfeltételeknek. Szerkezetstabilizáló hatása van például a diszulfidhidaknak vagy peptidgerincet áthidaló gyűrűs szerkezeteknek, amely elemek ötvözése nagymértékben visszaszoríthatja a természetes belső mozgékonyt. Esetenként, a rögzítettebb térszerkezetű aminosavak, például a prolin beépítése is eredményezheti a konformációs mozgékonyt lecsökkenését. Ez utóbbi környezetében az amidkötés jól ismert *transz-cisz* izomerizációja azonban komplikálhatja a helyzetet [139—143] (4.5. ábra). A peptidok dinamikus viselkedéséről globális képet kaphatunk a T_1 , illetve T_2 adatok (longitudinális és transzverzális relaxációs idők) ismeretében. A molekulára jellemző intramolekuláris hidrogénhidak analízise, illetve a csatolá-



4.5. ábra. Egy peptid gerincatomjai és az oldalláncok C^β atomjai, ahol néhány „rövid” és „középtávú” NOE távolságot tüntettünk fel

si állandók meghatározása további szerkezetfüggő adatokat eredményezhet. Ám részletekbe menő térszerkezet-vizsgálatot csak akkor kísérhetünk meg, ha a jellegzetes proton-proton távolságokat ismerjük.

4.1. KONFORMÁCIÓANALÍZIS NUKLEÁRIS OVERHAUSER EFFEKTUS (NOE) MÓDSZEREK SEGÍTSÉGÉVEL

4.1.1. Peptidek jellegzetes 1H - 1H távolságai

Jelöljük $d_{AB}(i, j)$ -nek az i . és j . aminosav adott A, B atomjainak távolságát. A következők protontávolságok (d) explicit ismerete a szerkezetmeghatározási szempontból döntő lehet:

$$d_{\alpha N}(i, j) = : d(\alpha H_i, NH_j) \quad (4.1)$$

$$d_{NN}(i, j) = : d(NH_i, NH_j) \quad (4.2)$$

$$d_{\alpha\alpha}(i, j) = : d(\alpha H_i, \alpha H_j) \quad (4.3)$$

$$d_{\alpha\beta}(i, j) = : \min\{d(\alpha H_i, \beta H_j)\} \quad (4.4)$$

$$d_{N\beta}(i, j) = : \min\{d(NH_i, \beta H_j)\} \quad (4.5)$$

Így például a (4.1) egyenlet értelmében egyértelműen meghatározható az i . aminosav α szénatomjához kapcsolódó hidrogén

(αH_i) és a j . aminosav NH hidrogénatomjának (NH_j) távolsága ($d_{\alpha\text{N}}[i, j]$). Ugyanakkor a legtöbb aminosav esetében a β szénatomhoz két geminális helyzetű hidrogénatom kapcsolódik, ezért ugyanezen α helyzetű hidrogénatom távolsága ($d_{\alpha\beta}[i, j]$) a β helyzetű protonoktól már nem egyértelmű. A (4.4) egyenletben szereplő „min” arra utal, hogy a két távolság közül a rövidebbet célszerű a mért NOE-értékkel azonosítani.

Szekvenciális NOE-ről akkor beszélünk, amikor $j = i \pm 1$, amely esetben a $d_{\alpha\text{N}}(i, j)$, $d_{\text{NN}}(i, j)$, $d_{\alpha\alpha}(i, j)$, $d_{\alpha\beta}(i, j)$ és $d_{\text{N}\beta}(i, j)$ távolságok a primer szekvenciában egymást követő aminosavak megfelelő hidrogénatomjainak a távolsága. Ettől eltérő esetben, amikor $j < i - 1$ vagy $j > i + 1$, a meghatározott távolságadatok a közvetlenül össze nem kapcsolódó aminosavak térbeli elhelyezkedésére utalnak. Az utóbbi esetben a mért $d_{\alpha\text{N}}(i, j)$, $d_{\text{NN}}(i, j)$, $d_{\alpha\alpha}(i, j)$, $d_{\alpha\beta}(i, j)$ és $d_{\text{N}\beta}(i, j)$ távolságértékek az aminosavszekvencia függvényei, hiszen a kialakult térszerkezet az adott aminosavsorrend függvénye. Ezeket a távolságokat „aminosav-szekvencia specifikus” távolságoknak hívjuk. A fentiek értelmében egy N aminosavból álló polipeptidláncre jellemző az ($N^* N^* 5$)-ös mátrix értékkészlete. A távolságok közül azonban csak azok az értékek használhatók fel NOE mérések adatainak összevetése során, amelyek 4, illetve 5 Å-nél rövidebbek. Ennek a távolságmegszorításnak a fizikai hátterében az áll, hogy a mért NOE-k, amelyek a spinek „térén át” történő dipol-dipol csatolásának következményei, a távolság hatodik hatványával fordítottan arányosak [132, 133]:

$$\eta_{ij} \approx r_{ij}^{-6} f(\tau_c). \quad (4.6)$$

A (4.6) egyenletben szereplő NOE-érték (η_{ij}) a besugárzott és a megfigyelt két proton távolságával (r_{ij}), illetve a korrelációs idővel (τ_c) arányos. Itt kell megemlítenünk azonban, hogy az NOE jellegű intenzitásváltozás függ a molekula méretétől, valamint annak mozgékonyaságától is. A molekula sztochasztikus mozgását leíró korrelációs időt (τ_c) az alábbi összefüggés határozza meg:

$$\tau_c = \frac{4\pi\mu a^3}{3kT}, \quad (4.7)$$

ahol a a molekulát magában foglaló gömb sugara és μ az oldószer viszkozitása. Ha a molekulán belüli konformációs átrendeződés lényegesen gyorsabb, mint a teljes molekula rotációs-transzlációs

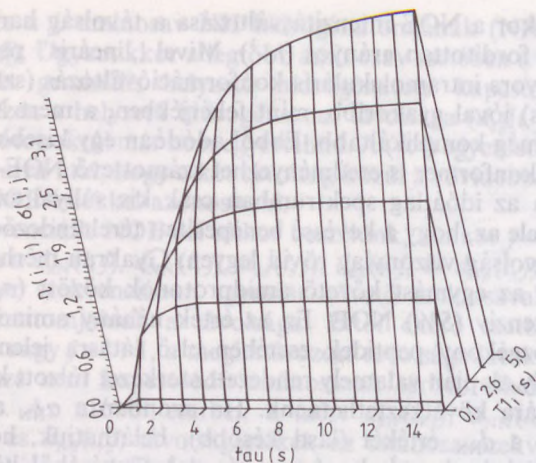
mozgása, akkor a NOE intenzitásváltozása a távolság harmadik hatványával fordítottan arányos (r^{-3}). Mivel „lineáris” peptidek esetében a gyors intramolekuláris konformációváltozás (szterikus átrendeződés) jóval gyakoribb, mint fehérjékben, a mért NOE-k értelmezése még komplikáltabb. Ebből adódóan egy kisebb benépesítettségű konformer is eredményezhet számottevő NOE-t, még akkor is, ha az időátlag spektrumban csak kis súllyal szerepel. Ennek feltétele az, hogy a kevésbé benépesített térelrendezésben a vizsgált távolság viszonylag rövid legyen. Gyakran mérhető kis peptidekben az egymást követő amidprotonok között (σ_{NN}) viszonylag intenzív (5%) NOE. Ez az érték néhány aminosavból felépülő mozgékony peptidek esetében első látásra jelentősnek tűnhet, amely alapján valamely rendezett szerkezet túlzott konformációs súlyára következtethetnénk. Ha azonban a σ_{NN} alapján kiszámoljuk a d_{NN} értékét (lásd később), beláthatjuk, hogy az NOE intenzitásának r^{-3} -al arányos távolságfüggéséből következően, bár az NOE százalékos értéke viszonylag nagy, az ebből megállapítható konformációs súly kicsi.

A nukleáris Overhauser-effektus tehát az adott magok közötti keresztrelaxációs sebesség függvénye, amely 1D spektrumok esetében jelintenzitás-változás formájában mérhető. 2D spektrumokban (NOESY vagy ROESY spektrumban) a megfelelő protonok közötti NOE-k keresztcsúcsokként észlelhetők. Ezen jelek kialakulási sebessége (*buildup rate*) a kezdeti periódusban a magok közötti távolság adott hatványával fordítottan arányos. Ez az összefüggés már csak azért is közelítő jellegű, mert elsősorban a környező protonok jelenléte miatt, a jelintenzitás növekedésének kialakulási sebessége (*NOE buildup rate*) hamarosan elveszíti lineáris karakterét. Az NOE intenzitás maximálása a nem szelektív megfigyelési pulzus késleltetésének (τ) függvényében perdöntő, ha a mért NOE-értékeket távolságvértékekké kívánjuk átszámítani. Kis peptidek esetében az NOE-intenzitás kialakulásának τ (4.2. ábra) függéséről hitelesnek tűnő képet ad a következő egyenlet:

$$\eta_{ij} = \sigma_{ij} * T_{1i} * (1 - \exp[-\tau/T_{1i}]), \quad (4.8)$$

ahol T_{1i} az i . proton longitudinális relaxációs ideje. Ha a T_{1i} -k ismeretében τ megválasztható úgy, hogy a τ/T_{1i} hányados eleghendően nagy legyen. Így a korábbi egyenlet a

$$\sigma_i = \eta_i(j)/T_{1i} \quad (4.9)$$



4.6. ábra. A (4.8) egyenlet mindkét oldalát osztjuk $\sigma(i, j)$ -vel $\{\eta(i, j)/\sigma(i, j) = T_{1i} * (1 - \exp[-\tau/T_{1i}])\}$ és ábrázoljuk a $\eta(i, j)/\sigma(i, j) = f(\tau, T_{1i})$ felszínt. Ha adott T_{1i} esetén τ elegendően nagy, akkor $\eta(i, j)/\sigma(i, j)$ jól közelíthető T_{1i} értékével

formára egyszerűsödik. Ha tehát a H_j proton megfelelő módon történő besugárzása a H_i protonon $\eta_i(j)$ növekményt okoz (NOE), akkor a H_i -re számolt, dipol-dipol keresztrelaxációs sebesség (σ_i) a (4.9) egyenlet segítségével megbecsülhető (4.6. ábra). Ha a T_{1i} -k közül a leghosszabb longitudinális relaxációs időt $T_{1(\max)}$ -al jelöljük, akkor a gyakorlatban $\tau = 5T_{1(\max)}$ időintervallum elegendő peptidok esetében (tipikusan 5–10 s). Ahhoz, hogy a mért NOE-értékek értelmezhetőek legyenek, a besugárzó „impulzuscsoomagok” késleltetése szükséges, hogy az eredeti alapállapotra jellemző Boltzman-eloszlás helyreállhasson.

4.1.2. Peptidek kvantitatív konformációanalízise NOE módszerek segítségével

A nukleáris Overhauser-effektus (NOE) [129, 132, 133, 144–148] bizonyos megszorítások mellett, a molekulán belüli protontávolságok meghatározását teszi lehetővé. Pontossága akár a 0,1 Å-öt is elérheti. Ha azonos korrelációs idő jellemzi az egész molekulát, akkor a protonok között mért keresztrelaxációs sebességek

és a megfelelő távolságok hatodik (vagy harmadik) hatványának szorzata egy molekulán belül konstans. Így ha egy peptiden belül lehetőség nyílik egy referenciaként használható keresztrelaxációs sebesség (σ_{ref}) meghatározására, melyhez tartozó proton—proton távolság [d_{ref}] független a konformációtól, akkor elvileg bármely mért σ_i alkalmas a megfelelő protonok közötti távolság (d_i) kiszámítására.

$$\left(\frac{d_i}{d_{\text{ref}}}\right)^n = \frac{\sigma_{\text{ref}}}{\sigma_i} \quad (n = -3 \text{ vagy } -6) \quad (4.10)$$

Leggyakrabban a molekula egy metilénsoportjában található két proton közötti σ -értéket szokás referenciaként felhasználni, mivel a geminális protonok távolsága ($d_{\text{ref}} = 1,75 \text{ \AA}$) független a konformációtól. Elvileg tehát egyetlen konformert tartalmazó molekula esetében, ha a megfelelő csúcok szelektíven besugározhatóak és megfelelő referencia NOE áll rendelkezésünkre, így a kérdéses interproton távolságok adott hiba mellett meghatározhatók. A hétköznapi szóhasználat pontatlan, mert nem az NOE-k aránya, hanem a keresztrelaxációs sebességek (σ_i -k) arányának a meghatározása teszi lehetővé a távolságok kiszámítását. A σ_i a mért NOE és a longitudinális relaxációs érték (T_{1i}) alapján számolható (4.8 egyenlet).

Az NMR időskálájából eredően, a konformációs egyensúlyban levő molekulák bármely konformációfüggő távolsága a különböző konformerekre jellemző távolságok súlyozott értékével arányos

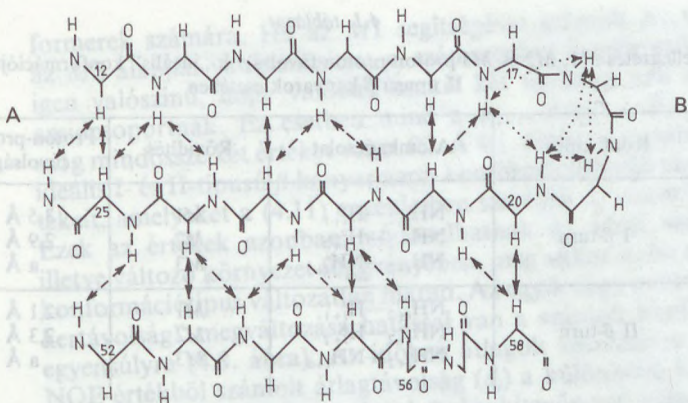
$$\frac{1}{d_i^n} = \sum_{j=1}^{\text{összeskonf.}} p_j \frac{1}{d_{ij}^n} \quad (4.11)$$

ahol p_j a j . konformer súlya. A nevezőben szereplő n hatványkitevő szokványos értéke -3 vagy -6 , amely elsősorban a molekula méretétől függ. Ezért, egy dinamikus egyensúlyban levő konformerkeverék esetében ismernünk kell az egyes konformerek betöltöttségi állapotát (p_j), valamint minden egyes konformer geometriai paramétereit (d_{ij}) és végül a jelen levő komponensek explicit számát. Ugyanakkor az NMR-spektroszkópiai mérések alapján sem a konformerek száma, sem a keverékben szereplő egyes konformerek geometriai adatai (a korábban említett d_{ij} -k) nem határozhatók meg. A szükséges geometriai adatokat (a d_{ij} pro-

tontávolságokat) molekuláris dinamikai, molekuláris mechanikai vagy ab initio számítások során nyerhetjük. Az így kiszámított d_{ij} távolságok segítségével az NOE-mérés útján meghatározott d_i távolság már értelmezhetővé válik. Mivel egy n komponensű rendszernél $(n-1)$ független, a konformációra jellemző NOE mérése szükséges, a feladat csak egyszerűbb esetekben (kis számú egyensúlyi konformer) oldható meg kielégítő pontossággal.

Térjünk most vissza a korábban példaként felhozott kisméretű lineáris peptid konformációs problémájára, ahol a mért 5%-os NOE-érték ($\eta_{\text{NH}(i)/\text{NH}(i+1)} = 5\%$) első látásra a túlzott rendezettség érzését keltette. (Egy metilencsoport két geminális protonja között, a mérhető NOE értéke 30–40%, amelyhez tartozó interproton távolság 1,75 Å.) (4.7. ábra.) Mivel kis peptidekben az amidprotonok longitudinális relaxációs ideje 0,8 s körüli érték, a mért 5%-os $\eta_{\text{NH}(i)/\text{NH}(i+1)}$ értékhez tartozó keresztrelaxációs sebességet vehetjük 6,5%-osnak. Legyen továbbá $\sigma_{\text{ref}} = 50\%$ -os, amelyhez tartozó protontávolság (d_{ref}) 1,75 Å. A molekulán belüli konformációs átrendeződést gyorsabbnak tekintve, mint a teljes molekula rotációs-transzlációs mozgásánál (d^{-3} közelítés), a (4.10) egyenlet alapján az egymást követő két amidproton időátlag távolsága ($d_{\text{NH}(i)/\text{NH}(i+1)}$) körülbelül 3,5 Å. A karakterisztikus $d_{\text{NH}(i)/\text{NH}(i+1)}$ távolság nyújtott gerinckonformáció esetében 4,3 Å (4.7. ábra A) míg β -kanyarokban 2,6 Å (4.7. ábra B). Feltételezve, hogy csak a fenti két konformáció dinamikus egyensúlyáról van szó, a (4.11) egyenlet alapján a hajtókanyar konformációsúlya alig haladja meg a 20%-ot. Tehát a konformációs súlyok kiszámítása a mért NOE-k és T_1 -értékek alapján elvégezhető a (4.10) és (4.11) egyenletek segítségével, amennyiben a tiszta konformerek geometriai paraméterei ismeretesek. Azokat az interproton távolságokat, amelyek a konformációváltozásokat híven tükrözik és az NOE-mérések által nyomon követhetők, jellegzetes vagy „marker” távolságoknak szokásos hívni.

Ha NOE segítségével egy peptidfragmens esetében a gerinckonformáció hajlítottságát kívánjuk meghatározni, akkor legcélszerűbb alapul venni az $M1$, $M2$ és $M3$ távolságokat (4.1. táblázat és 4.8. ábra). Azok az interproton távolságok a leghasználhatóbbak, amelyek értéke egy (esetleg több) gerinc torziószög megváltozásával ($\Delta\phi_{i+1}$, $\Delta\psi_{i+1}$, $\Delta\phi_{i+2}$, $\Delta\psi_{i+2}$) jellegzetesen módosul. Jó példa erre a különböző β -kanyar típusok NOE-n alapuló megkülönböztetése. Az I- és a II-típusú β -kanyarok közös vonása, hogy a



4.7. ábra. Nyújtott (A) és β -kanyar (B) konformációjú peptidlánc sematikus rajza a karakterisztikus $d_{\text{NH}(i)/\text{NH}(i+1)}$ távolságokkal

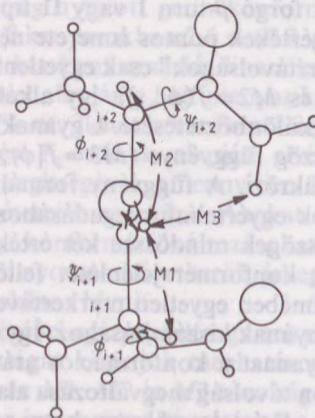
„középső” amidsík nagyjából merőleges a konformer fősíkjára, amelyet a C_i^α , C_{i+1}^α és C_{i+2}^α atomok határoznak meg. Ugyanakkor az I típusúhoz képest a II típusban a középső amidsík mintegy 150° -kal el van forgatva (lásd később). Ezért ha azt akarjuk eldönteni, hogy a szóban forgó β -turn I vagy II típusú, akkor a ψ_{i+1} és a ϕ_{i+2} torziószögértékek pontos ismerete nélkülözhetetlen. Az $M1$ és az $M2$ „markertávolságok” csak egyetlen torziószög függvényei ($M1 = f(\psi_{i+1})$ és $M2 = f(\phi_{i+2})$), így alkalmasak az említett két β -turn típus megkülönböztetésére. Ugyanakkor az $M3$ proton-távolság két torziószög függvénye ($M3 = f[\phi_{i+2}, \psi_{i+1}]$) és, amint ezt a 4.8. ábra is tükrözi. A függvény formális invertálása nem vezethet a szögpárok egyértelmű megadásához (4.8. ábra). Ha a ψ_{i+1} és ϕ_{i+2} torziószögek mindössze két értékpárt vehetnek fel, azaz mindössze két konformer jelenlétét feltételezzük, akkor a (4.11) egyenlet értelmében egyetlen markertávolság is elegendő a két β -turn típus arányának kiszámításához. Így akár arra is lehetőség nyílik, hogy ugyanazt a konformációs arányt két különböző típusú proton-proton távolság megváltozása alapján, két független úton is kiszámítsuk. Ezért tetszőleges, hogy az $M1$ vagy az $M2$ értékeit használjuk, mivel ugyanazt a p_j -értéket kell elvileg kapnunk, ha valóban csupán két konformer egyensúlyáról van szó. Ilyen „túlhatározott” esetekben lehetőség nyílik tehát arra, hogy NMR-mérések alapján következtessünk az egyensúlyban lévő kon-

4.1. táblázat

Jellegetes $M1$, $M2$ és $M3$ proton-proton távolságok „ideális” konformációjú I és II típusú β -kanyarok esetében

Konf. típus	Atomkapcsolat	Rövidítés	Proton-proton távolság
I β -turn	$\text{NH}_{i+2}-\text{H}_{i+1}^{\alpha}$	$M1$	3,5 Å
	$\text{NH}_{i+2}-\text{H}_{i+2}^{\alpha}$	$M2$	2,9 Å
	$\text{NH}_{i+2}-\text{NH}_{i+3}$	$M3$	a Å
II β -turn	$\text{NH}_{i+2}-\text{H}_{i+1}^{\alpha}$	$M1$	2,1 Å
	$\text{NH}_{i+2}-\text{H}_{i+2}^{\alpha}$	$M2$	2,3 Å
	$\text{NH}_{i+2}-\text{NH}_{i+3}$	$M3$	a Å

a. Bár az ideális β -kanyarokban a ψ_{i+2} torziószög értéke 0° , a kristzográfiai adatok analízise alapján ψ_{i+2} egy széles tartományban ($-45^\circ < \psi_{\text{Ser}} < +45^\circ$) ingadozik. Ezért az $M3$ távolságértéke a β -kanyarokban bizonytalan.

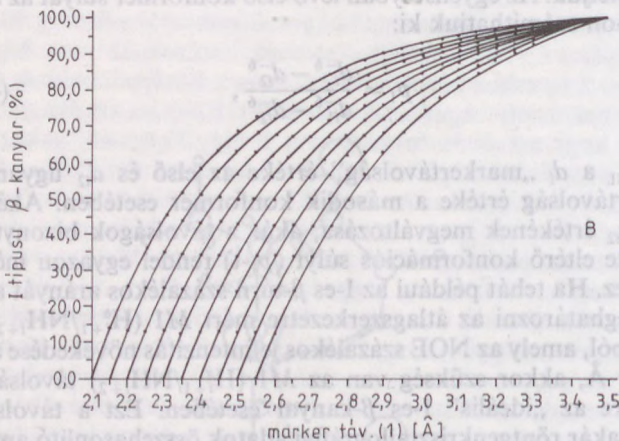
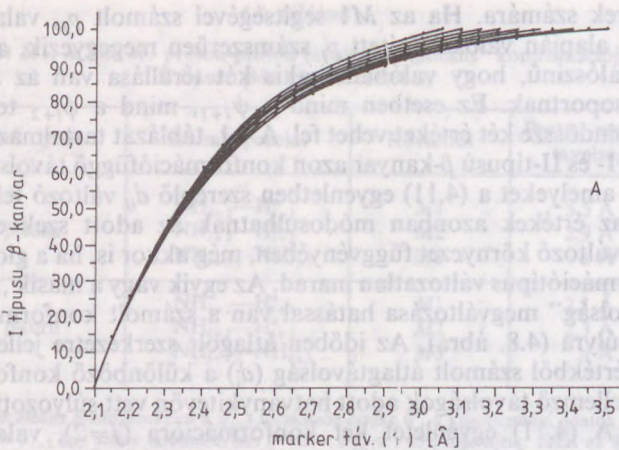


4.8. ábra. β -Turn szerkezetazonosítás során leggyakrabban használt markertávolságok ($M1$, $M2$ és $M3$) konformációfüggése; $M1=f(\psi_{i+1})$, $M2=f(\varphi_{i+2})$, valamint $M3=f(\varphi_{i+2}, \psi_{i+2})$. Míg adott $M1$ vagy $M2$ értékekhez csak két-két torziószögérték rendelhető, egyetlen $M3$ távolságérték még nem határozza meg egyértelműen a $\varphi_{i+2}, \psi_{i+2}$ szögpárok értékét

formerek számára. Ha az $M1$ segítségével számolt p_j , valamint az $M2$ alapján valószínűsített p_j számszerűen megegyezik, akkor igen valószínű, hogy valóban csakis két térállása van az adott amidcsoportnak. Ez esetben mind a ψ_{i+1} , mind a ϕ_{i+2} torziószög mindössze két értéket vehet fel. A 4.1. táblázat tartalmazza az ideális I- és II-típusú β -kanyar azon konformációfüggő távolságértékeit, amelyeket a (4.11) egyenletben szereplő d_{ij} változó felvesz. Ezek az értékek azonban módosulhatnak az adott szekvencia, illetve változó környezet függvényében, még akkor is, ha a globális konformációtípus változatlan marad. Az egyik vagy a másik „markertávolság” megváltozása hatással van a számolt konformációs egyensúlyra (4.8. ábra). Az időben átlagolt szerkezetre jellemző, NOE-értékből számolt átlagtávolság (d_i) a különböző konformerekre jellemző távolságok adott hatványkitevőn vett súlyozott összege. A (4.11) egyenletet két konformációra ($j=2$), valamint $n=-6$ esetre felírva és a $p_2=1-p_1$ helyettesítést elvégezve p_1 -et kifejezhetjük. Az egyensúlyban lévő első konformer súlyát az alábbi módon számíthatjuk ki:

$$p_1 = \frac{d_i^{-6} - d_{i2}^{-6}}{d_{i1}^{-6} - d_{i2}^{-6}}, \quad (4.12)$$

ahol d_{i1} a d_i „markertávolság” értéke az első és d_{i2} ugyanezen markertávolság értéke a második konformer esetében. Akár d_{i1} vagy d_{i2} értékének megváltozása, akár a távolságok bizonytalan ismerete eltérő konformációs súlyt (p_1 -t) rendel egyazon mért d_i értékhez. Ha tehát például az I-es β -turn százalékos arányát akarjuk meghatározni az átlagszerkezetre mért $M1$ (H_{i+1}/NH_{i+2}) távolságból, amely az NOE százalékos jelintenzitás növekedése alapján 2,9 Å, akkor szükség van az $M1$ (H_{i+1}/NH_{i+2}) távolság ismeretére az „ideális” I-es β -kanyar esetében. Ezt a távolságot elvileg akár röntgenkristallográfiai adatok összehasonlító analízise alapján, akár elméleti számítások segítségével meghatározhatjuk, amely tapasztalati értéke 3,5 Å. Tételizzük fel, hogy ugyanez a távolság az „ideális” II-es β -kanyar esetében $2,3 \pm 0,2$ Å között ingadozik. (A bizonytalanság oka lehet akár számítási pontatlanság, akár a diffrakciós adatok átlagolásának következménye.) Ekkor a számolt p -értékek 68% és 91% közé esnek, amely jelentős bizonytalanságot kölcsönöz az egyensúlyi arány megállapításának (4.9. ábra). Amennyiben a konformációs paramétereket („marker-



4.9. ábra. Az I- és a II-típusú β -kanyarok konformációs arányainak változása a tiszta konformerekben számolt d_{11} vagy d_{12} értékek függvényében.

A) $p_1 = (d_1^{-6} - 2,1^{-6}) * (d_{11}^{-6} - 2,1^{-6})^{-1}$, ahol $3,1 \text{ \AA} \leq d_{11} \leq 3,5 \text{ \AA}$ között változik,

B) $p_1 = (d_1^{-6} - d_2^{-6}) * (3,5^{-6} - d_{12}^{-6})^{-1}$, ahol $2,1 \text{ \AA} \leq d_{12} \leq 2,55 \text{ \AA}$ között változik

távolságokat”) hasonló konformációjú fehérjefragmensek krisztallográfiai adatainak átlagolása alapján határozzuk meg, úgy a becsült bizonytalanság nagysága ($\pm 0,2 \text{ \AA}$) nem tekinthető el túlzottnak. Esetenként nagyobb pontosság érhető el, ha közvetlenül a vizsgált szekvencia „markertávolságait” határozzuk meg minden egyes lehetséges konformer esetében például számítások alapján.

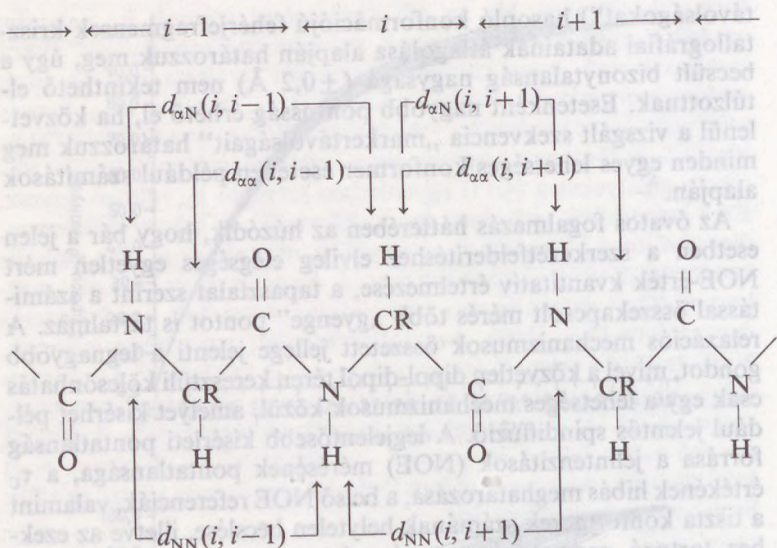
Az óvatos fogalmazás hátterében az húzódik, hogy bár a jelen esetben a szerkezetfelderítéshez elvileg elégséges egyetlen mért NOE-érték kvantitatív értelmezése, a tapasztalat szerint a számítással összekapcsolt mérés több „gyenge” pontot is tartalmaz. A relaxációs mechanizmusok összetett jellege jelenti a legnagyobb gondot, mivel a közvetlen dipol-dipol téren keresztüli kölcsönhatás csak egy a lehetséges mechanizmusok közül, amelyet kísérhet például jelentős spindiffúzió. A legjelentősebb kísérleti pontatlanság forrása a jelintenzitások (NOE) mérésének pontatlansága, a τ_c értékének hibás meghatározása, a belső NOE referenciák, valamint a tiszta konformerek számának helytelen becslése, illetve az ezekhez tartozó geometriai paraméterek pontatlan megadása lehet [149]. Körültekintő tervezéssel, valamint párhuzamos kísérletek végzésével számos hiba valószínűsége csökkenthető. Például az egyensúlyi konformerek számának megadása gyakran bizonytalan, mely probléma egyes modelleszaladok esetében orvosolható, ha az azonos körülmények között felvett CD-spektrumok dekonvolúcióját elvégezzük.

4.1.3. Kis peptidekben megfigyelt konformációs-specifikus ^1H — ^1H távolságok

4.1.3.1. Gerinckonformáció meghatározása szekvenciális (rövid távú) NOE-k alapján

Ha a (4.1—4.5) egyenletekben definiált $d_{\alpha\text{N}}(i, j)$, $d_{\text{NN}}(i, j)$, $d_{\alpha\alpha}(i, j)$, $d_{\alpha\beta}(i, j)$ és $d_{\text{N}\beta}(i, j)$ távolságok $d_{\alpha\text{N}}(i, i \pm 1)$, $d_{\text{NN}}(i, i \pm 1)$, $d_{\alpha\alpha}(i, i \pm 1)$, $d_{\alpha\beta}(i, i \pm 1)$ és $d_{\text{N}\beta}(i, i \pm 1)$ alakba írhatók, akkor szekvenciális NOE-k távolságértékeiről beszélünk.

A szekvenciális NOE adatok összegyűjtése során kizárólag a peptidláncban egymást követő aminosavak megfelelő hidrogénatomjainak távolságmegadására törekszünk (1. séma). Ugyanakkor

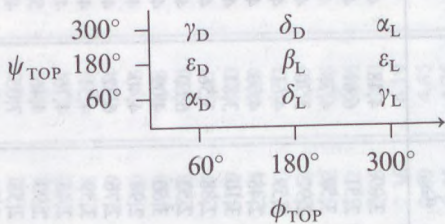


1. séma

figyelmén kívül hagyunk minden $j=i\pm 1$ -től különböző távolság-
 adatot, mivel a $j < i-1$ vagy a $j > i+1$ esetekben a közvetlenül össze-
 nem kapcsolódó aminosavak térbeli helyzetére utalnak a távolság-
 adatok. A tapasztalatok értelmében a fehérjékben fellépő jellegze-
 tes gerinckonformáció típusok már két egymással összekapcsolt
 aminosavegység (triamid rendszer) segítségével sikeresen modellez-
 hetők (lásd 1. és 6. fejezet). Tehát hosszabb peptidek esetében a
 szekvenciális NOE-k meghatározása analóg a megfelelő N- és a
 C-terminálison védett dipeptid gerinckonformációt leíró összes
 NOE adatának megadásával. Így a szekvenciális NOE-k alapján
 meghatározott gerinckonformáció gondolata mögött valójában a
 „dipeptid-közelítés” gondolata húzódik, amely során csupán 4
 független változó segítségével definiáljuk a konformációs alteret
 (1.8. egyenlet).

Mivel a triamid rendszerek konformációanalízise visszavezethető
 a dipeptid-rendszerekben azonosítható két vicinális helyzetű
 torziószög (ϕ , ψ) meghatározására, a peptidgerinc tipikus konfor-
 mációit itt is az egyedi elnevezések segítségével adjuk meg (α_L ,

$\alpha_D, \beta_L, \gamma_L, \gamma_D, \delta_L, \delta_D, \varepsilon_L$ és ε_D), amelyek körülbelüli elhelyezkedését a $f(\phi, \psi)$ felszínen a 2. séma mutatja.



2. séma

Mivel a 9 gerinckonformer ($\alpha_L, \alpha_D, \beta_L, \gamma_L, \gamma_D, \delta_L, \delta_D, \varepsilon_L, \varepsilon_D$) torziószög értékeinek egyetemes megadása nem lehetséges, a szekvenciális NOE adatok értelmezésénél a For-L-Ala-L-Ala-NH₂ molekula (tipikus triamid rendszer) esetében számított *ab initio* torziószögadatokat használtuk fel (4.2. táblázat).

A (4.11) egyenlet alapján számolt valószínűségek előfeltétele, hogy a „tiszta” konformerekhez tartozó d_{ij} távolságokat pontosan ismerjük, melyet elsősorban az alkalmazott számítási eljárás finomítása révén érhetünk el. Nagyobb rendszerek esetében nincs lehetőség arra, hogy a kiválasztott protontávolságokat közvetlenül a vizsgált szekvencián végzett *ab initio* számolásokból nyerjük, ugyanakkor a nem kvantumkémiai módszerek szolgáltatotta távolságok alkalmazása csökkenti az egyensúlyi rendszerek meghatározhatóságát. Egy lehetséges út ezért, hogy a For-L-Ala-L-Ala-NH₂ modellvegyület (lásd 4.2. táblázat) 49 különböző, *ab initio* számolások segítségével meghatározott gerinckonformációiból nyerhető 98 lokális diamid térszerkezet alapján számoljuk a konformációfüggő ¹H—¹H távolságokat. Ezen általános konformációcsalád-specifikus *ab initio* távolságok jó kiindulási alapjai lehetnek a szerkezetmeghatározásnak, amelyek felhasználásával azonosítjuk a peptidben található másodlagos szerkezeti elemeket. Ezt követően MM vagy az MD módszerek alkalmazásával tovább finomíthatjuk a konkrét aminosavszekvencia függvényében a konformációs paramétereket. A triamid rendszer különböző konformerjeiben (4.2. táblázat) a $5 \cdot 2 = 10$ lehetséges gerinc-proton távolság közül a $d_{N\alpha}(d_{NH(i)/H\alpha(i)})$, $d_{NN}(d_{NH(i)/NH(i+1)})$ és $d_{\alpha N}(d_{H\alpha(i)/NH(i+1)})$ távolságértékek figyelembevétele tűnik NMR-es szemszögből a legcélsze-

A térszerkezettől függő ^1H - ^1H távolságok a For-L-Ala-L-Ala- NH_2 modellvegyület 49 különböző, ab initio számolások segítségével meghatározott gerinckonformációjában

A peptidgerinc proton-távolságai^a

	NH_{i+1} H_{i+1}	NH_{i+1} NH_{i+2}	NH_{i+1} H_{i+2}	NH_{i+1} H_{i+1}	NH_{i+2} H_{i+2}	NH_{i+2} NH_{i+3}	NH_{i+3} H_{i+2}	NH_{i+3} H_{i+1}	H_{i+1} H_{i+2}
	d_{NH}	d_{NN}	d_{NH}	d_{HN}	d_{NH}	d_{NN}	d_{HN}	d_{NH}	
$\alpha\text{D}\alpha\text{D}^c$	2,27	2,88	5,12	2,91	2,25	2,82	3,09	4,48	4,84
$\alpha\text{D}\beta\text{L}$	2,27	2,81	5,40	2,90	2,85	4,29	2,51	6,61	4,38
$\alpha\text{D}\delta\text{D}$	2,25	2,84	5,33	2,99	2,64	2,35	3,59	4,78	4,64
$\alpha\text{D}\delta\text{L}$	2,29	2,87	5,40	2,81	2,93	2,72	3,70	3,70	4,45
$\alpha\text{D}\gamma\text{D}$	2,28	2,80	5,02	2,80	2,24	3,64	3,59	4,61	4,65
$\Delta\gamma\text{L}$	2,27	2,83	5,35	2,90	2,89	3,70	2,43	4,00	4,60
$\alpha\text{L}\delta\text{L}$	2,82	2,83	5,39	3,44	2,94	2,57	3,10	3,81	4,44
$\beta\text{L}\alpha\text{D}$	2,85	4,28	5,67	2,49	2,26	2,84	2,88	3,56	4,57
$\beta\text{L}\alpha\text{L}$	2,84	4,31	4,69	2,55	2,84	4,29	2,52	6,60	4,62
$\beta\text{L}\delta\text{D}$	2,84	4,28	4,83	2,50	2,79	2,28	3,60	4,09	4,65
$\beta\text{L}\delta\text{L}$	2,84	4,27	4,42	2,46	2,94	2,64	2,94	4,40	4,43
$\beta\text{L}\epsilon\text{D}$	2,83	4,24	5,65	2,43	2,25	4,60	2,76	6,32	4,54
$\beta\text{L}\gamma\text{D}$	2,85	4,24	5,71	2,40	2,22	3,66	3,59	4,31	4,54
$\beta\text{L}\gamma\text{L}$	2,84	4,28	4,50	2,50	2,90	3,71	2,43	4,75	4,33
$\delta\text{D}\alpha\text{D}$	2,71	2,30	4,15	3,55	2,26	2,80	2,90	4,46	5,33
$\delta\text{D}\beta\text{L}$	2,79	2,19	3,95	3,60	2,86	4,31	2,53	7,05	4,66
$\delta\text{D}\delta\text{D}$	2,71	2,26	3,89	3,54	2,82	2,28	3,61	5,51	4,72
$\delta\text{D}\epsilon\text{D}$	2,74	2,23	4,09	3,52	2,26	4,60	2,83	6,69	5,33
$\delta\text{D}\epsilon\text{L}$	2,78	2,27	4,00	3,53	2,93	4,52	2,54	6,49	4,61
$\delta\text{D}\gamma\text{D}$	2,72	2,25	3,94	3,51	2,24	3,64	3,60	4,23	5,31
$\delta\text{D}\gamma\text{L}$	2,72	2,27	4,52	3,55	2,89	3,74	2,42	4,16	4,64
$\delta\text{L}\alpha\text{D}$	2,94	2,67	4,72	2,94	2,27	2,86	2,88	4,75	4,85
$\delta\text{L}\beta\text{L}$	2,94	2,50	5,00	3,09	2,83	4,29	2,51	6,65	4,36

δLδD	2,94	2,62	5,08	3,69	2,92	2,78	2,28	3,59	5,11	4,30
δLeD	2,90	2,49	3,96	5,10	2,52	2,26	4,57	2,80	6,60	4,66
δLyD	2,94	2,54	4,67	4,77	2,98	2,23	3,67	3,59	4,58	4,81
δLyL	2,94	2,57	4,60	5,42	3,00	2,91	3,67	2,44	3,96	4,64
εDαD	2,23	3,66	5,64	5,69	3,57	2,27	2,82	2,86	4,41	5,32
εDβL	2,26	4,60	5,55	7,91	2,73	2,83	4,28	2,51	6,66	4,64
εDδD	2,26	4,65	5,61	6,34	3,06	2,73	2,27	3,59	4,35	4,79
εDδL	2,26	4,62	5,38	4,71	3,31	2,93	2,60	3,02	4,60	4,45
εDeD	2,26	4,48	6,14	7,06	2,58	2,24	4,63	2,85	6,16	4,56
εDyD	2,26	4,50	6,26	4,52	2,60	2,21	3,67	3,59	4,14	4,66
εDyL	2,26	4,62	5,26	4,93	2,79	2,91	3,63	2,46	4,69	4,27
γDβL	2,24	3,62	5,12	7,25	3,63	2,89	4,38	2,49	6,94	4,54
γDδD	2,23	3,62	5,14	5,69	3,57	2,84	2,14	3,60	5,43	4,67
γDδL	2,23	3,64	5,41	3,96	3,57	2,95	2,57	3,03	4,43	4,47
γDeD	2,23	3,67	5,73	7,76	3,55	2,26	4,60	2,68	6,70	5,31
γDeL	2,25	3,61	5,24	6,40	3,56	2,94	4,56	2,47	6,47	4,63
γDyD	2,23	3,63	5,50	5,64	3,54	2,23	3,68	3,59	4,10	5,31
γDyL	2,23	3,66	5,61	4,80	3,58	2,91	3,70	2,44	4,09	4,58
γLaD	2,90	3,67	5,52	3,62	2,42	2,77	2,77	2,90	4,33	4,52
γLβL	2,91	3,78	5,46	7,50	2,44	2,88	4,36	2,48	6,39	4,31
γLδD	2,90	3,82	5,69	4,72	2,26	2,82	1,94	3,62	3,95	4,41
γLδL	2,90	3,68	5,12	5,73	2,40	2,95	2,55	3,02	3,46	4,40
γLeD	2,93	3,61	5,26	6,23	2,30	2,26	4,56	2,75	6,50	4,47
γLeL	2,90	3,70	5,06	7,29	2,43	2,92	4,66	2,36	6,19	4,54
γLyD	2,90	3,64	5,59	4,50	2,38	2,23	3,68	3,59	4,65	4,42
γLyL	2,90	3,69	4,91	5,55	2,41	2,91	3,71	2,45	4,26	4,53

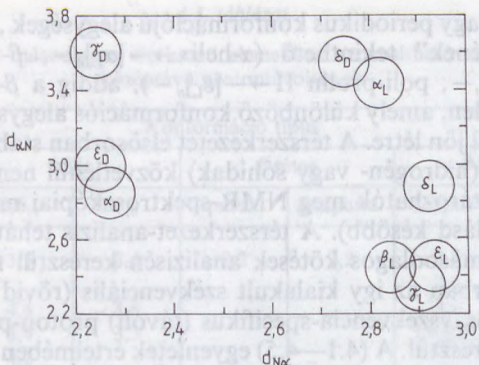
a) For-L-Ala-L-Ala-NH₂ modelvegület gerincprotonjainak távolságát ab initio (HF/3—21G) geometriaoptimalás segítségével határoztuk meg.
 b) A „marker-távolságok” NMR-spektroszkópiában szokásos rövidítései.

c) A gerinckonformáció leírásánál alkalmazott konformációs kódok definíciói és a torzítógöszög értékei a következők voltak:

α_0 [$\varphi=61,8^\circ$, $\psi=31,9^\circ$, α_L [$\varphi=-68,6^\circ$, $\psi=-17,5^\circ$], β_L [$\varphi=-167,6^\circ$, $\psi=169,9^\circ$], γ_L [$\varphi=-84,5^\circ$, $\psi=68,7^\circ$], γ_D [$\varphi=74,3^\circ$, $\psi=-59,5^\circ$], δ_L [$\varphi=-126,2^\circ$, $\psi=26,5^\circ$], δ_D [$\varphi=-179,6^\circ$, $\psi=-43,7^\circ$], ϵ_L [$\varphi=-74,7^\circ$, $\psi=167,8^\circ$] és ϵ_D [$\varphi=64,7^\circ$, $\psi=-178,3^\circ$].

rűbbnek. (Míg a $d_{N\alpha}$ távolság COSY típusú proton-proton kapcsolatot tükröz, a $d_{\alpha N}$ és d_{NN} távolságok már szekvenciális NOE információk.) A három kiválasztott távolságtípus közül a d_{NN} értékei változnak a legszélesebb tartományban ($d_{NN}^{\delta D} \approx 1,9 \text{ \AA}$, $d_{NN}^{\varepsilon L} \approx 4,6 \text{ \AA}$), mégsem tekinthetjük azokat konformációérzékenyeknek, mert igen hasonló távolságértékeket vehetnek fel például a konformációs enantiomerpárok (pl. $d_{NN}^{\gamma L} \approx d_{NN}^{\gamma D} \approx 3,7 \pm 0,1 \text{ \AA}$ [4.2. táblázat]). Továbbá a β_L , γ_L , γ_D , ε_L , ε_D gerinckonformációkhoz tartozó távolságértékek meghaladják a peptidok esetében NOE által meghatározható értéket ($d_{NN} > 3,5 \text{ \AA}$). A d_{NN} távolságtól eltérően a $d_{N\alpha}$ és $d_{\alpha N}$ távolságok alapján a konformációs enantiomerek jól megkülönböztethetők (pl. $d_{N\alpha}^{\gamma L} \approx 2,9 \pm 0,1 \text{ \AA}$, $d_{N\alpha}^{\gamma D} \approx 2,25 \pm 0,1 \text{ \AA}$, $d_{\alpha N}^{\gamma L} \approx 2,35 \pm 0,1 \text{ \AA}$, $d_{\alpha N}^{\gamma D} \approx 3,6 \pm 0,1 \text{ \AA}$). Így a két marker távolság valamennyi gerinckonformáció esetében 2,3 és 3,6 \AA közé esik. További szerencse, hogy eltekintve egy-egy nagyobb értékingadozástól ($d_{\alpha N} \pm 0,5 \text{ \AA}$ az ε_D és $\pm 0,3 \text{ \AA}$, az δ_L konformációcsalád esetében) a számolt értékek szórása kicsi és független a megelőző vagy rá következő aminosav gerinckonformációjától. Ha tehát a környezet konformációt befolyásoló hatása oly mértékű, hogy a szerkezet alapjellege változatlan marad, akkor ezen két távolságtípus értéke alig változik (4.10. ábra). Ábrázolva a $d_{N\alpha}$ -t a $d_{\alpha N}$ függvényében jól elkülönülő 5 klasztert azonosíthatunk (4.10. ábra). Ismerve az 1D- és 2D-NOE eljárásokból származó távolságértékek meghatározásának várható hibáit, érdemes tovább finomítani a konformációs hozzárendelést a korábban említett d_{NN} változó bevezetésével. Az új változó hatására az esetleges asszignációs problémák tovább egyszerűsödnek, hiszen például a $\beta_L/\gamma_L/\varepsilon_L$ konformációs családok esetében a harmadik dimenzió bevezetése, azaz a $d_{N\alpha}$, $d_{\alpha N}$ mellett a d_{NN} változó figyelembevétele, a két dimenzióban esetenként észlelt bizonytalanságot tovább csökkenti. Mivel a távolságok igen különbözők a harmadik dimenzióban ($d_{NN}^{\beta L} \approx 4,3 \pm 0,1 \text{ \AA}$, $d_{NN}^{\gamma L} \approx 3,7 \pm 0,2 \text{ \AA}$, $d_{NN}^{\varepsilon L} \approx 4,6 \pm 0,1 \text{ \AA}$), a harmadik változó bevezetésével létrehozott, a konformációtípusokat szórásaikkal együtt reprezentáló gömbök jobban elkülönülnek, mint ezek kétdimenziós vetülete (4.10. ábra) a $d_{N\alpha}$, $d_{\alpha N}$ altéren.

Hasonló módon a ε_D/α_D és δ_D/α_L konformációtípusok is sikeresen elkülöníthetők, ha mind a $d_{N\alpha}$ és $d_{\alpha N}$, mind pedig a d_{NN} markertávolságok értékeit kiszámoljuk. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a 9 különböző gerinckonformáció-típus a $d_{N\alpha}$, $d_{\alpha N}$ és d_{NN} szekvenciális protontávolságok értékei alapján elvben



4.10. ábra. A $d_{N\alpha}$ -t a d_{NN} függvényében ábrázolva a 9 gerinckonformáció-típust (α_L , α_D , β_L , γ_L , γ_D , δ_L , δ_D , ϵ_L és ϵ_D), jól elkülönülő 5 klasztert azonosíthatunk. A γ_D és δ_L egyelemű, míg a [δ_D , α_L] és [ϵ_D , α_D] két kételemű klasztert alkot. A [β_L , γ_L és ϵ_L] konformációtípusok egy háromelemű klasztert formálnak, amely összhangban van az NMR-spektroszkópia azon gyakorlati tapasztalatával, amely szerint az β -régióba tartozó gerinckonformációk nehezen különíthetők el

mindig elkülöníthető egymástól, és így akár egy hosszabb fragmens gerinckonformációja is meghatározható. A gyakorlatban azonban a NOESY spektrum keresztcsúcsai egymásra lapolódnak, és így a meghatározás csupán a szekvenciális NOE-k alapján nehezen kivitelezhető. Ahol tehát lehetőség nyílik az aminosavszekvencia-specifikus NOE-k mérésére, ott kívánatos a középtávú, illetve szekvenciálisan távol eső protonok közt észlelt NOE-k (távoli NOE-k) beépítésével meghatározni a másodlagos szerkezetet. Ezek a „távoli” NOE-k természetesen nem általánosíthatók, hiszen a mindenkori peptid vagy fehérje feltekeredésének következményei. Ám az úgynevezett tipikus másodlagos szerkezeti elemek rendre tartalmaznak tipikus NOE távolságadatokat.

4.1.3.2. Gerinckonformáció meghatározása nemszekvenciális NOE-k alapján

Klasszikus értelemben az α -hélix, β -redőzött réteg, poliprolin II és a β -turn szerkezeti elemekkel nem rokonítható konformációjú fehérjeszegmenseket „nem tipikus” vagy „rendezetlen” térszerkezetűnek tekintjük. Míg az első három másodlagos szerkezeti elem

ismétlődő vagy periodikus konformációjú alegységek „tér szerkezeti polimerjének” tekinthető (α -helix $\rightarrow -[\alpha_L]_n-$, β -redőzött réteg $\rightarrow -[\beta_L]_n-$, poli-prolin II $\rightarrow -[\epsilon_L]_n-$), addig a β -turn szerkezet az egyetlen, amely különböző konformációs alegységek kombinációja által jön létre. A térszerkezetet elsősorban stabilizáló gyenge kötések (hidrogén- vagy sóhidak) közvetlenül nem, vagy csak nehezen határozhatók meg NMR-spektroszkópiai módszerek segítségével (lásd később). A térszerkezet-analízis tehát nem az azt összetartó másodlagos kötések analízisének keresztül történik, hanem elsősorban az így kialakult szekvenciális (rövid távú), valamint aminosavszekvencia-specifikus (távoli) proton-proton távolságokon keresztül. A (4.1—4.5) egyenletek értelmében az amidprotonok, valamint az alfa-protonok relatív térbeli helyzetének megadása az elsődleges cél (4.2. táblázat) (4.11. ábra). $^1\text{H}-\{^1\text{H}\}$ —NOE-k akkor mérhetők ezen protonok között, ha a távolság rövidebb, mint 4, esetleg 5 Å. Mindezek a viszonylag rövid és konformációfüggő proton-proton távolságok képezik a másodlagos szerkezeti elemek meghatározásainak alapját. Ez azt jelenti, hogy adott konformációtípus esetében karakterisztikus NOESY keresztcsúcs-elrendeződéseket várunk. A spektrumban észlelt NOE-k, illetve NOESY keresztcsúcsok segítségével valószínűsíthetünk szerkezet típusokat, amely konformációkra jellemző összes „rövid” proton-proton távolság meghatározását célozzuk, amely gyakran további NOE adatok „felkutatását” jelenti (*back calculated NOE*). Egy ilyen iteratív eljárás folyamatábráját mutatja be a 4.1. ábra. Fontos megjegyezni ugyanakkor, hogy az NOE hiányából nem következtethetünk arra, hogy az adott távolság szükségszerűen nagyobb, mint 4,5 Å. Számos algoritmus ismert, amely segítségével iteratív módon polipeptid térszerkezetet határozhatunk meg, mint például a tisztán távolságon alapuló DG (Distance Geometry) [137] eljárás különböző módoszatai; DISGEO, DSPACE, DGII stb., vagy a kizárólag szögek által definiált konformációs altéren értelmezett DISMAN, DIANA vagy DGEOM programok. Ezen eljárásoktól némiképpen eltér a korlátozott molekuladinamikai (restrained molecular dynamics [RMD]), valamint a simulated annealing (SA) módszer, amelyek hagyományos mechanikai alapokon nyugvó energiátágra az atomok térbeli helyzetétől függ (CHARMM, XPLOR, AMBER, SYBYL, GROMOS stb.). A korábbi DG eljárást sikerrel alkalmazták például egy ciklohexapeptid térszerkezet-vizsgálata során, ahol DISMAN program se-

4.3. táblázat

A leggyakoribb másodlagos szerkezeti elemekben azonosítható szekvenciális és középtávú protontávolságok

távolság típus	Konformáció típus					
	hélix		β -réteg		β -kanyar	
	$3,6_{13}$	3_{10}	paral.	antiparal.	I-típus ^a	II-típus
$d_{\alpha N}(i, i+1)$	3,5	3,4	2,2	2,2	3,4 3,2	2,2 3,2
$d_{\alpha N}(i, i+2)$	4,4	3,8			3,6	3,3
$d_{\alpha N}(i, i+3)$	3,4	3,3			$3,6 \pm 0,5$	$4,2 \pm 0,5$
$d_{\alpha N}(i, i+4)$	4,2					
d_{NN}	2,8	2,6	4,3	4,2	2,6 2,4	4,5 2,4
$d_{NN}(i, i+2)$	4,2	4,1			3,8	4,3
$d_{\beta N}$	$3,3 \pm 0,8^b$	$3,6 \pm 0,7$	$3,8 \pm 0,6$	$4,2 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,7$ $4,1 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,5$ $4,1 \pm 0,5$
$d_{\alpha\beta}(i, i+3)$	$3,5 \pm 1,0$	$4,1 \pm 1,0$				

^a Mivel a β -kanyarokban két nem azonos konformációs alegység (pl. α_L , δ_L) azonosítható, értékpárok megadása szükséges.

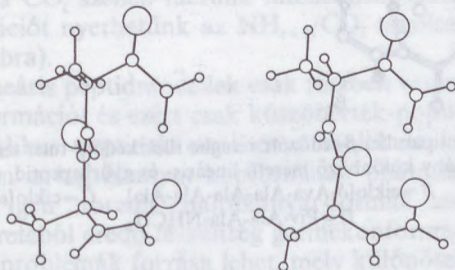
^b A $d_{\beta N}$ és $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ távolságok függenek a $\chi_1(N-C^\alpha-C^\beta-X)$ torziószögtől, aminek következtében a távolságingadozás jelentős lehet.

gítségével határozták meg a kijelölhető kiindulási szerkezeteket, amelyek a további RMD és MM számolások alapját képezték. Egy másik esetben az endotelin-1 peptid (21 aminosavból álló peptid, amelyet két diszulfidhid stabilizál) konformációanalízise vált megoldhatóvá 137 NOE és 31 nem NOE eredetű kényszerfeltétel figyelembevételével. A három különböző RMD programcsomag (CONGEN, DISCOVER, valamint az XPLOR) hasonló térszerkezetet hitelesített. Ha külön-külön szemügyre vesszük a periodikus és aperiodikus másodlagos szerkezeti elemeket, célszerű a β -kanyarokkal kezdeni, mivel ezek a legkevesebb aminosavat magukban foglaló rendszerek, ugyanakkor dinamikus viselkedésük karakterisztikus „peptidtulajdonság”.

Az érdeklődés középpontjába nemcsak azért került ez a konformációs elem, mert számos biokémiai folyamatban közvetlenül részt vevő aminosav β -kanyar téralkatot vesz fel, hanem azért is, mert a legkisebb olyan szerkezeti elem, amely röntgenkristallográfiai adatok tanúsága szerint a természetes fehérjekörnyezetből kiemelve is megőrizheti eredeti téralkatát. Szilárd fázisú konformerek röntgendiffrakciós adatai alapján kiderült, hogy bizonyos aminosavpárok a véletlen előfordulási valószínűségnél szignifikánsan gyakrabban azonosítható β -turn konformációban. Ilyen geometriai tulajdonsággal rendelkeznek például a -Pro-Ser-, -Pro-Thr-, -Pro-Asn-, -Val-Ser- stb. fragmensek. A hajtűkanyar térszerkezetek definíciója értelmében ($C_i^\alpha - C_{i+3}^\alpha$ távolság kisebb mint 7 \AA) számos β -turn típus létezhet, ám globuláris fehérjék statisztikai vizsgálata arról tanúskodott, hogy az I, II és a III-típustól eltérő hajtűkanyar-szerkezetek csak ritkán fordulnak elő. Mivel a III-as az I-es típustól az NMR analízisek során alig különböztethető meg, nagyobb rendszerek konformációanalízise során csak két β -turn fajtáról szokásos beszélni (lásd 4.11. és 4.12. ábrák). A β -turn szerkezetek konformációs és spektroszkópiai tulajdonságait lényegesen kevésbé ismerjük, mint például a helixek vagy β -redők hasonló jellegzetességeit, noha VENKATACHALAM [5] már a hatvanas évek elején elméleti megfontolásokra támaszkodva megjósolta a hajtűszerkezetek létezését. CHOU és FASMAN a hetvenes évek derekán statisztikai analízis segítségével hasznos adatokat gyűjtött a β -turn szerkezetek előfordulási valószínűségéről globuláris fehérjékben. Az alapvető metodikai problémát az okozza, hogy a természetes szekvenciális környezetben, de abból kiemelve is, különösen mozgékony szerkezeti egységgel állunk szemben, amely karakterisztikus tulajdonsága még a legmerevebb ciklikus modellvegyületekben is megmarad. Bár számos modellvegyületből növesztett egykristály diffrakciós analízise bizonyította, hogy az I vagy a II típus β -turn önmagában is létezik, mostanáig nem sikerült egyetlen olyan β -turn modellvegyületet sem szintetizálni, mely még ha csupán egyetlen oldószerben is, de bizonyíthatóan egyetlen konformer formájában volna jelen. Amint arra korábban már rámutattunk, sem a CD-, vagy az FT-IR-, sem az NMR-spektroszkópiai módszer nem képes két vagy több konformer dinamikus egyensúlya esetén a geometria egyértelmű azonosítására. Tehát részben módszertani korlátok

	β, β_P	α -Hélix	3_{10} -Hélix	Turn I	Turn II	Turn I'	Turn II'	Half-turn
$d_{\alpha N}(i, i+4)$		=====						
$d_{\alpha \beta}(i, i+3)$		=====	=====					
$d_{\alpha N}(i, i+3)$		=====	=====	---		---	---	
$d_{NN}(i, i+2)$		=====	=====	---	---	---	---	
$d_{\alpha N}(i, i+2)$		=====	=====	---	---	---	---	---
$d_{NN}(i, i+1)$	-----	-----	-----	█	█	█	█	█
$d_{\alpha N}(i, i+1)$	=====	-----	-----	---	█	---	---	█

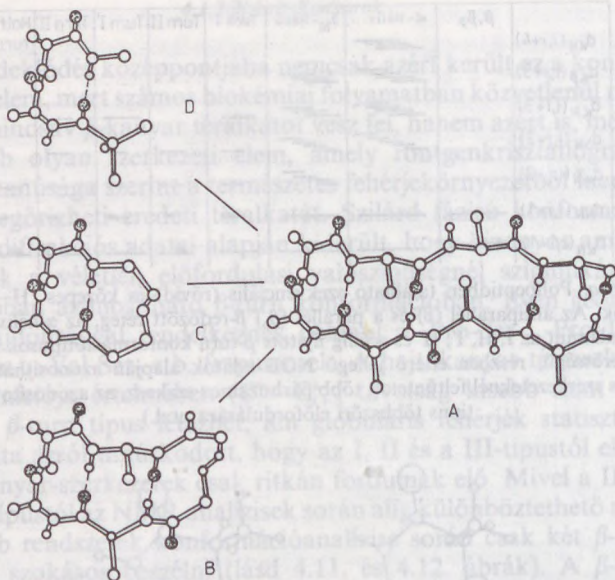
4.11. ábra. Polipeptidben található szekvenciális (rövid) és közepes ^1H – ^1H távolságok. Az antiparallel (β) és a paralel (β_P) β -redőzött réteg, az α -hélix, a 3_{10} -hélix, valamint az I, II, I', II' és a félig nyitott β -turn konformációtípusok részben eltérő erősségű, részben eltérő jellegű NOE adatok alapján azonosíthatók. (A helikális szerkezeteknél feltüntetett több párhuzamos szakasz, az azonosított NOE típus többszöri előfordulására utal.)



4.12. ábra. A For-Ala-Ala-NH₂ I ($\varphi_{i+1} = -60^\circ$, $\psi_{i+1} = -30^\circ$, $\varphi_{i+2} = -90^\circ$ és $\psi_{i+2} = 0^\circ$) és II ($\varphi_{i+1} = -60^\circ$, $\psi_{i+1} = 120^\circ$, $\varphi_{i+2} = 80^\circ$ és $\psi_{i+2} = 0^\circ$)-es típusú β -turn konformációja

miatt, az elmúlt időszakra az volt a jellemző, hogy a molekula tervezésekor alapvető szempontként merült fel a modellpeptidek szerkezeti mozgékonyságának csökkentése. Az elmúlt három évtizedben több száz speciális aminosavszekvenciájú lineáris modellvegyület mellett, SCHWYTYER alapötlete nyomán számos, különböző méretű ciklopeptidet is szintetizáltak (lásd 4.13. ábra). Szerkezeti okokból talán a ciklohexapeptidek voltak a legígéretesebb β -turn modellvegyületek, továbbá azok, amelyekbe a természetes aminosavak mellett néhány nemtermészetes aminosavat is beépítettek.

Triamid rendszerek vagy más néven „védett-dipeptidek” ($-\text{CONH}-\text{CHR}-\text{CONH}-\text{CHR}'-\text{CONH}-$) esetében elvileg



4.13. ábra. Egy antiparallel β -redőzött rétegbe illeszkedő β -turn sematikus ábrája (A), valamint néhány különböző méretű lineáris- és gyűrűspeptid, amely a β -turn részt modellezi. B=ciklo[δ -Ava-Ala-Ala-Ala-Ala], C=ciklo[ϵ -Aca-Ala-Ala], D=Piv-Ala-Ala-NHCH₃

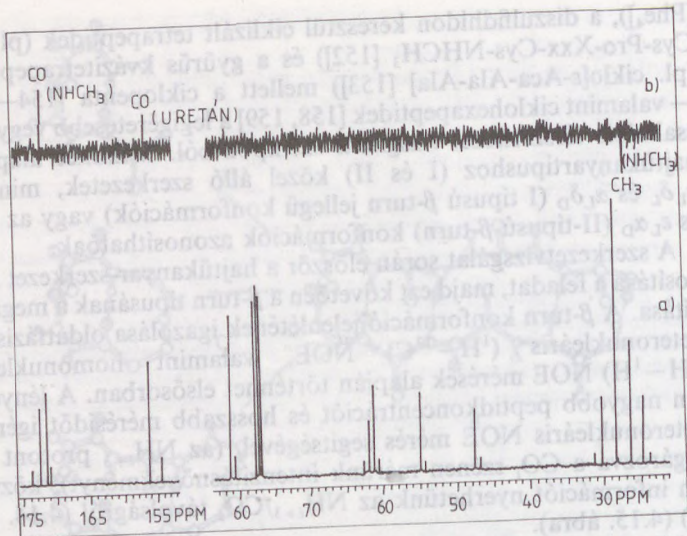
81 különböző gerinckonformáció létezése jósolható, amelyek közül ab initio számítások több tucat szerkezet létezését igazolták (lásd 2. fejezet). Ám, ha akár csak féltucatnak is ezen szerkezetek közül azonos az energiatartama, akkor elegendő számú markertávolság hiányában a szerkezetazonosítás már nem végezhető el. Ezért nagy jelentősége van az aminosavoldalláncok térszerkezet-stabilizáló hatásának, amely nagymértékben csökkentheti a gerinckonformerek számát. Technikai okok miatt csupán azok a β -turn szerkezetű modellek analizálhatók, amelyek 2, esetleg 3 különböző gerinckonformációt vehetnek fel mindössze. A ciklopeptid gyűrű tagszámának növekedtével a gerinckonformációk száma is növekszik, a belső feszültség viszont csökken. A feszültebb csak természetes aminosavakból felépülő ciklotripeptidek (pl. ciklo[Pro₃] [150]), illetve a nemcsak természetes α -aminosavakat tartalmazó ciklo(Met- β Ala-Phe-Pro) [151], valamint a ciklotetrapeptidek (pl. ciklo-

[Phe₄]), a diszulfidhídon keresztül ciklizált tetrapeptidek (pl. Ac-Cys-Pro-*Xxx*-Cys-NHCH₃ [152]) és a gyűrűs kvázitetrapeptidek (pl. ciklo[ε-Aca-Ala-Ala] [153]) mellett a ciklopenta [154–157] — valamint ciklohexapeptidek [158, 159] a legígéretesebb vegyület-családok térszerkezet-vizsgálati szempontból. Mindkét alapvető hajtúkanyartípushoz (I és II) közel álló szerkezetek, mint az $\alpha_L\delta_L$ és $\alpha_L\delta_D$ (I típusú β -turn jellegű konformációk) vagy az $\epsilon_L\gamma_D$ és $\epsilon_L\alpha_D$ (II-típusú β -turn) konformációk azonosíthatóak.

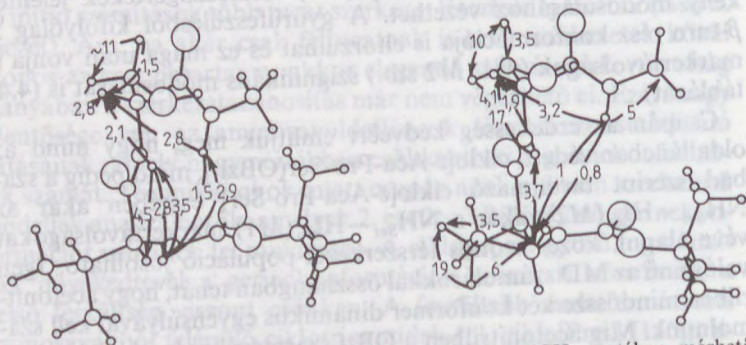
A szerkezetvizsgálat során először a hajtúkanyar-szerkezet azonosítása a feladat, majd ezt követően a β -turn típusának a megállapítása. A β -turn konformáció jelenlétének igazolása oldatfázisban heteronukleáris (¹H–¹³C) NOE, valamint homonukleáris (¹H–¹H) NOE mérések alapján történhet elsősorban. A lényegesen nagyobb peptidkoncentrációt és hosszabb mérésidőt igénylő heteronukleáris NOE mérés segítségével, (az NH_{*i*+3} protont besugározva a CO_{*i*} szénen mérünk intenzitásnövekményt), közvetlen információt nyerhetünk az NH_{*i*+3}/CO_{*i*} távolságról (4.14. ábra) (4.15. ábra).

Míg a lineáris peptidmodellek csak részben vesznek fel hajtúkanyar-konformációt és ezért csak küszöbérték-populációról beszélhetünk, ciklikus peptidek esetében a molekula konstitúciójából következően a hajtúkanyar-konformáció óhatatlanul jelen van. Esetenként igen „torzult” hajtúkanyar-formák azonosíthatók. A gyűrűk méretéből eredő feszültség gerinckonformációt torzító hatása újabb problémák forrása lehet, mely különösen kis tagszámú modellek esetén (pl. ciklotetrapeptid) torziószögértékek jelentékeny módosulásához vezethet. A gyűrűfeszülésből kifolyólag a β -turn rész konformációja is eltorzulhat és ez maga után vonja a markertávolságok (*M1*, *M2* stb.) szignifikáns módosulását is (4.4. táblázat).

Csupán az érdekesség kedvéért említjük meg, hogy mind az oldalláncban védett, ciklo[ε-Aca-Pro-Ser(OBzl)], mind pedig a szabad szerint tartalmazó ciklo[ε-Aca-Pro-Ser] esetében akár az NH_{Ser}–H^α_{Ser} (*M2*), akár a NH_{Ser}–H^α_{Pro} (*M1*) markertávolságokat véve alapul, közel azonos térszerkezet-populáció jósolható. Igen valószínű az MD számolásokkal összhangban tehát, hogy acetónitrilben mindössze két konformer dinamikus egyensúlyával kell számolnunk. Míg acetónitrilben a OBzl származéknak csak 12%-a II típusú β -turn, addig a szabad szerin oldalláncú (-OH) analóg már több mint 25% II típusú β -turnt tartalmaz. A II típusú β -turn



4.14. ábra. Heteronukleáris NOE mérés a Boc-Pro-Ser-NHCH₃ molekulán. A NH(CH₃) amidprotont besugározva a ¹³C különbség spektrumban a CO_{uretán} szén rezonanciajelének intenzitásnövekedése látható (fent). Ha számottevő NOE mérhető az NH_{i+3} és az uretán karbonilszénatomja között, akkor a β-turn szerkezeten túlmenően az 1 < -4 hidrogénhid megléte is becslést tehetünk, amely bár oldatban nem szükséges feltétele a hajtúkanyar konformációnak, gyakran stabilizálja azt. ¹H-¹H-NOE mérések segítségével az NH_{i+3}/H_{i+1}²⁺, valamint az NH_{i+3}/NH_{i+1} távolságok becslésén keresztül lehet a β-turn szerkezetre következtetni (4.18. ábra)



4.15. ábra. A Boc-Val-Ser-NHCH₃ és Boc-Pro-Ser-NHCH₃ esetében mérhető ¹H-¹H-NOE-k alapján számolt (lásd 4.10. egyenlet) keresztrelaxációs (σ) értékek százszorosa van feltüntetve

4.4. táblázat

Kvantitatív NOE mérések alapján meghatározott konformációs küszöbértékek néhány β -turn modellvegyület esetében

modell	markertávolságok	távolság ^a intervallum	type I	type II
			A	
			B	
			C	
			D	
			E	
			F	
			G	
A	$\begin{bmatrix} \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Ser}}^{\alpha} & 2,78 \\ \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Pro}}^{\alpha} & 3,17 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 2,9 & 2,3 \\ 3,5 & 2,3 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 89 \pm 3\% \\ 88 \pm 2\% \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 11 \pm 3\% \\ 12 \pm 2\% \end{bmatrix}$
B	$\begin{bmatrix} \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Ser}}^{\alpha} & 2,64 \\ \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Pro}}^{\alpha} & 3,17 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 2,9 & 2,3 \\ 3,5 & 2,3 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 74 \pm 1\% \\ 72 \pm 2\% \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 26 \pm 1\% \\ 28 \pm 1\% \end{bmatrix}$
C	$\begin{bmatrix} \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Ser}}^{\alpha} & 2,68 \\ \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Pro}}^{\alpha} & 3,03 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 2,9 & 2,2 \\ 3,5 & 2,25 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 83 \pm 2\% \\ 87 \pm 4\% \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 17 \pm 2\% \\ 13 \pm 4\% \end{bmatrix}$
D	$\begin{bmatrix} \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Ser}}^{\alpha} & 2,70 \\ \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Pro}}^{\alpha} & 2,70 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 2,9 & 2,3 \\ 3,5 & 2,15 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 82\% \\ 78\% \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 18\% \\ 22\% \end{bmatrix}$
E	$\begin{bmatrix} \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Ser}}^{\alpha} & 2,50 \\ \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Pro}}^{\alpha} & 2,30 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 2,9 & 2,3 \\ 3,5 & 2,15 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 40 \pm 5\% \\ 53\% \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 60 \pm 5\% \\ 47\% \end{bmatrix}$
F	$\begin{bmatrix} \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Ser}}^{\alpha} & 3,00 \\ \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Pro}}^{\alpha} & 2,70 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 3,0 & 2,3 \\ 3,45 & 2,2 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 100\% \\ 72\% \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 0\% \\ 28\% \end{bmatrix}$
G	$\begin{bmatrix} \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Ser}}^{\alpha} & 2,85 \\ \text{NH}_{\text{Ser}}-\text{H}_{\text{Pro}}^{\alpha} & 2,30 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 2,25 & 2,9 \\ 3,45 & 2,25 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 7\% \\ 3\% \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 93\% \\ 97\% \end{bmatrix}$

^a MD alapon számolt geometriák teljesen relaxált szerkezetei szolgáltatták a markertávolságok szélsőértékeit.

^b A méréseket CD₃CN-ben végeztük.

jelenléte igen váratlan, mivel a korábban említett azonos gyűrűtag-számú ciklo[Ala-Ala- ϵ -Aca] modellvegyület a CD-spektroszkópia egyik sarokkövévé vált az elmúlt tíz évben azáltal, hogy 100%-ban I típusú β -turn szerkezetűnek vélték. Itt meg kell jegyeznünk, hogy a nyolcvanas évek elején publikált térszerkezet-bizonyítás nem

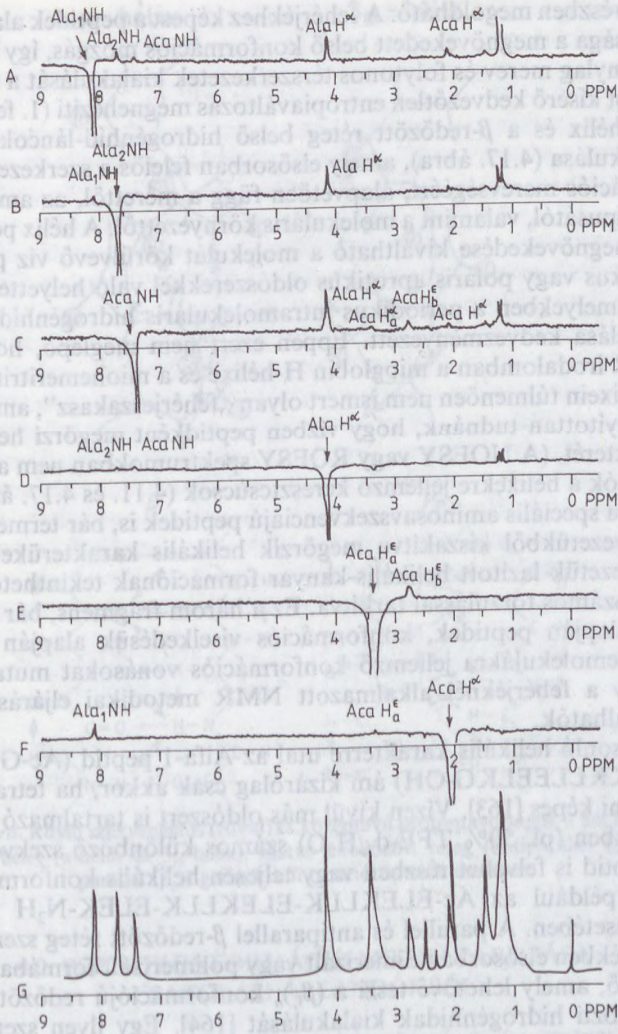
támaszkodott $^1\text{H}-\{^1\text{H}\}-\text{NOE}$ mérésekre. Újabb keletű NOE mérések alapján megállapíthatjuk, hogy „még” d_6 -DMSO-ban is legalább 20–30% II típusú β -turn van jelen az uralkodó I típus mellett (4.16. ábra).

Mivel a tapasztalat szerint az oldószer minőségétől függetlenül, ezen feszült β -turn modellek is mind konformerkeverékek, igen valószínűnek látszik, hogy aligha szintetizálható meg az „ideális”, csakis I avagy II típusú β -turn prototípusa. Ezt a meglátást támasztja alá az a megfigyelés is, mely szerint bár a ciklo[δ -Ava-Gly-Pro-Ser(O^tBu)-Gly] acetonitrilből növesztett egykristályában a diffrakciós adatok szerint egyetlen (I-típusú β -turn) konformer van jelen. Feloldva ugyanezt az egykristályt, oldatban konformerkeverék azonosítható, melyben a I-típusú β -turn körülbelül 85%-os részarányú.

A lineáris β -turn modellek esetében a hajtúkanyar térszerkezet mellett a „nyitott” vagy „Z-alakú” konformációk betöltöttsége is jelentős [160, 161], ezért kettőnél több konformáció jelenléte várható például a Boc-L-Pro-L-Ser-NHCH₃ [162] esetében is. (Mindez teljesen összhangban van az elméleti megfontolásokkal, illetve a számítások eredményeivel [163].) Ilyen esetben a konformerarány függ a használt markertávolság típusától, azaz nem mindegy, hogy az *M1* vagy az *M2* alapján számoljuk ki a konformerek arányát. Érdekes ugyanakkor, hogy a Boc-L-Pro-D-Ser-NHCH₃ acetonitrilben zömmel (90%) II-es β -turn formájában van jelen, ami lehetőséget ad a védett dipeptid referenciaként való használatára. A -Pro-Ser- modelleknél tapasztalt konformációs mozgékonytságot más nyílt láncú β -turn modelleknél is megfigyeltek.

4.1.3.2/B. α -Hélix, a β -redőzött réteg és nyújtott szerkezet

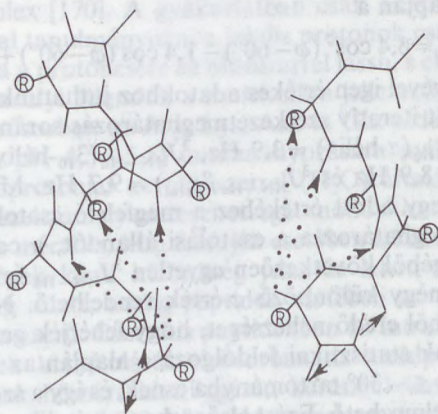
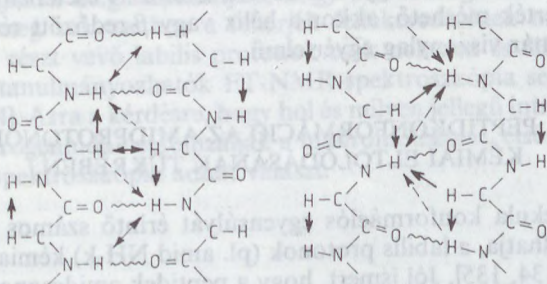
Noha fehérjékben a két leggyakoribb másodlagos szerkezeti elem a hélix és a β -redőzött réteg típusú gerinckonformáció, rövidebb peptidok esetében csupán speciális aminosavszekvenciák (homopolimerek [pl. H-(Lys)_n-OH]), gyakran speciális környezetben (pl. trifluor-etanolban) vehetik fel ezeket a periodikus másodlagos szerkezeteket. Az ismétlődő konformációs monomerekből [α -hélix, β -redőzött réteg, valamint a poli(prolin)II] felépülő tipikus konformációk térszerkezeti és spektroszkópiai sajátosságait homopolimereken tanulmányozták. A nagyszámú adatnak köszönhetően ma számos probléma (pl. a fehérjék hélixtartalmának meghatározása



4.16. ábra. A ciklo[Ala-Ala(ε)Aca] esetében mért $^1\text{H} - \{^1\text{H}\} - \text{NOE}$ -k, amelyek alapján a keresztrelaxációs értékek (σ_i) meghatározása történt

stb.) részben megoldható. A fehérjékhez képest a peptidek alapvető sajátága a megnövekedett belső konformációs mozgás, így ezek a viszonylag merev és folytonos térszerkezetek kialakulását a rendeződést kísérő kedvezőtlen entrópiaváltozás megnehezíti (1. fejezet). A α -hélix és a β -redőzött réteg belső hidrogénhid-láncolatának kialakulása (4.17. ábra), amely elsősorban felelős a szerkezet konformációs merevségéért, alapvetően függ a mérettől, az aminosavak típusától, valamint a molekuláris környezettől. A hélix populáció megnövekedése kiváltható a molekulát körülvevő víz poláris protikus vagy poláris aprotikus oldószerekkel való helyettesítésével, amelyekben a periodikus intramolekuláris hidrogénhidak kialakulása kedvezményezett. Éppen ezért nem meglepő, hogy az NMR irodalomban a mioglobin H-hélice és a miohemeritrin A és D hélicein túlmenően nem ismert olyan „fehérjeszakasz”, amelyről bizonyítottan tudnánk, hogy vízben peptidként megőrzi helikális karakterét. (A NOESY vagy ROESY spektrumokban nem azonosíthatók a hélixekre jellemző keresztcsúcsok (4.11. és 4.17. ábrák). Ezek a speciális aminosavszekvenciájú peptidek is, bár természetes környezetükből kiszakítva megőrzik helikális karakterüket, térszerkezetük lazított helikális-kanyar formációnak tekinthető csupán, számos torzulással tarkítva. Ez a három fragmens, bár méretük alapján peptidek, konformációs viselkedésük alapján főleg fehérjemolekulákra jellemző konformációs vonásokat mutatnak, és így a fehérjéknél alkalmazott NMR metodikai eljárásokkal vizsgálhatók.

Hasonló helikális karakterre utal az Alfa-1 peptid (Ac-GKLE-ELLKLLLEELKG-OH) ám kizárólag csak akkor, ha tetramerizálódni képes [163]. Vizen kívül más oldószert is tartalmazó rendszerekben (pl. 50% TFE- d_3 /H₂O) számos különböző szekvenciájú peptid is felvehet részben vagy teljesen helikális konformációt, mint például az Ac-ELEKLLK-ELEKLLK-ELEK-N₂H molekula esetében. A parallel és antiparallel β -redőzött réteg szerkezet fehérjékben elsősorban dimerizált vagy polimerizált formában fordul elő, amely lehetővé teszi a $(\beta_L)_n$ konformációjú redőzött láncok közti hidrogénhidak kialakulását [164]. Egy ilyen szerkezet nagyfokú rendezettségről tanúskodik, (β -redő/ β -kanyar/ β -redő motívum), amely kis peptidekben aligha figyelhető meg elsősorban entrópia okok miatt. Diszulfidhidakkal áthidalt dimer peptidmolekulák azonban gyakran felvehetnek igen hasonló $(\beta_L)_n$ gerinc-konformációt [165].

α -hélix 3_{10} -hélix β β_P 

4.17. ábra. Rövid szekenciális (rövid) és középtávú protonávolságok a két leggyakoribb hélix (α -hélix és 3_{10} -hélix), illetve β -redőzött réteg (antiparallel (β) és a parallel (β_P)) gerinckonformáció típusok esetében

4.2. PEPTIDKONFORMÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA CSATOLÁSI ÁLLANDÓKBÓL

KARPLUS [166a] már több mint harminc éve rámutatott arra, hogy a vicinális spin-spin csatolás 3J értéke függ a térszerkezettől. Később BYSTROV (166b), majd WÜTHRICH és mts. [167] analitikus alakban is felírható korrelációt állapítottak meg a $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ csatolási állandó és a két proton relatív térbeli helyzetét leíró φ

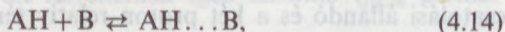
torziószög között. A mért csatolási állandók és röntgenkristallográfiai adatok alapján a

$${}^3J_{\text{HN-H}\alpha} = 6,4 \cos^2(\varphi - 60^\circ) - 1,4 \cos(\varphi - 60^\circ) + 1,9 \quad (4.13)$$

egyenlet segítségével igen értékes adatokhoz juthatunk, amelyek a 4.3. ábrán vázolt iteratív szerkezetmeghatározás során használhatók, mert ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}(\alpha\text{-hélix}) = 3,9$ Hz, ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}(3_{10}\text{-hélix}) = 4,2$ Hz, ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}(\beta_{\text{anti}}) = 8,9$ Hz és ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}(\beta_{\text{paral}}) = 9,7$ Hz. Míg azonban a φ torziószög egy adott értékéhez a megfelelő csatolási állandó egyértelműen meghatározza a csatolási állandót, a \cos függvény periodikus jellegéből következően egyetlen ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ értékhez nem kevesebb mint négy különböző φ -érték rendelhető. Némiképpen csökkenti az ebből eredő nehézséget, hogy fehérjék gerinckonformációs adatainak statisztikai feldolgozása alapján az L-aminosavak a $-180^\circ \leq \varphi \leq -30^\circ$ tartományba esnek, és így a szögfüggvény könnyebben értelmezhető. Ezért elsősorban periodikus konformációk esetében használhatók a csatolási állandók a konformációk azonosítására. Ha 3-5 egymást követő aminosav esetében hasonló ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ érték mérhető, akkor a hélix vagy β -redőzött réteg azonosítása már viszonylag egyértelmű.

4.3. PEPTIDKONFORMÁCIÓ AZ AMIDPROTONOK KÉMIAI ELTOLÓDÁSÁNAK TÜKRÉBEN

A molekula konformációs egyensúlyát érintő számos tényező befolyásolhatja, a labilis protonok (pl. amid NH-k) kémiai eltolódását is [134, 135]. Jól ismert, hogy a peptidek amidcsoportjaiban található hidrogénatomok relatív kémiai eltolódásértékét (ppm) befolyásolják a környező aminosavak oldalláncaiban található funkciócsoportok, valamint az oldószer [168], a hőmérséklet [169] és más tényezők. Régóta felhasználják a mozgékony (labilis) protonok cserélődési sebességét a makromolekulák szerkezetének és dinamikus viselkedésének tanulmányozására. Közel harminc éve, hogy elsőként EIGEN megadta a sav- vagy báziskatalizált kicserélődési reakciók kinetikai leírását. A sebességmeghatározó lépés általában a diffúzió által kontrollált hidrogénkötéses komplex kialakulása. Számos elméleti kinetikai leírása azóta is a hidrogénhidás rendszerek mélyebb megértését célozza

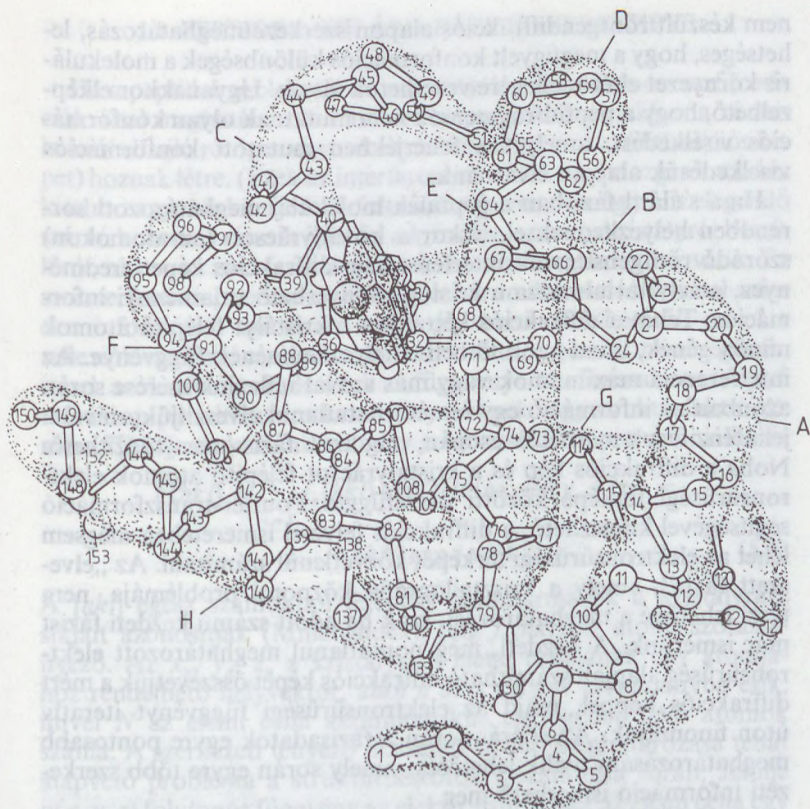


ahol AH a proton donor, B a proton akceptor AH. . . B a hidrogénhidras komplex [170]. A gyakorlatban csak akkor lehet kielégítő pontossággal tanulmányozni a labilis protonok cserélődésének kinetikáját, ha a protoncsere az oldószerrel lassú, s ekkor a meghatározott egyensúlyi állandók a molekulára jellemző relatív viszonyszámok. Elsősorban az Arg, Lys, Asn és Gln oldallánc protonjainak (300K, pH 4,5—5,5) tanulmányozására nyílik lehetőség. A gerinc amidprotonjai az oldószerrel (H₂O) általában igen gyorsan cserélődnek, amely cseresebbséget módosíthat a proton árnyékoltóságának mértéke. Míg fehérjék esetében a környezet indukálta cseresebbségek közti különbség jelentős lehet, éppen az eltérő árnyékoltóság miatt, addig peptidek esetében az oldószerrel való csere pillanatszerű. Ezért kis peptidekben az intramolekuláris hidrogénkötések kialakulását elsősorban az amidprotonok kémiai eltolódásának hőmérsékletfüggésén keresztül vizsgálhatjuk [171, 172]. Szokásos még különböző oldószerkeverékek a kémiai eltolódásra gyakorolt hatását tanulmányozni. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy bár hidrogénkötések határozzák meg sok esetben a fehérjék feltekeredésének módját, az ezekben részt vevő labilis protonok csak nehezen és félkvitatív módon tanulmányozhatók FT-NMR-spektroszkópia segítségével [173, 174]. Arra a kérdésre, hogy hol és milyen jellegű intramolekuláris hidrogénhidak stabilizálják a makromolekulát, elsősorban az FT-IR-spektroszkópia adhat választ.

5. PEPTIDEK KONFORMÁCIÓANALÍZISE A RÖNTGENKRISZTALLOGRÁFIA TÜKRÉBEN

A peptidek konformációiról kialakult mai képünket döntően befolyásolták a fehérjékről készített röntgendiffrakciós felvétel alapján meghatározott térszerkezetek. Bár a kezdeti kifelbontású mérések alapján csak a fehérjék alakjára és az α -helikális részek elhelyezkedésére lehetett következtetni, ezek a kísérletek mégis a konformációs szemléletmód alapköveit takták le. A korai időszakban kétségkívül a helikális másodlagos szerkezeti elem tanulmányozása látszott a legegyszerűbb feladatnak, ám még a majdnem teljesen helikális mioglobinnál készült kifelbontású felvételek sem fedtek fel olyan részletes képet, amely kezdetben lehetővé tette volna a fehérje térszerkezetének részletekbe menő leírását (5.1. ábra). Napjainkban már az esetenként 1,5 Å felbontású elektronsűrűségi térképek segítségével nemcsak a másodlagos szerkezeti alegységek azonosíthatók, hanem esetenként az oldalláncok térszerkezetei is tanulmányozhatók. A röntgenkrisztallográfia — mivel szilárd fázisú, kristályos mintát igénylő eljárás — döntően a dinamikus folyamatok során fellépő sztatikus állapotok szerkezetanalízisére alkalmas. Ezért a módszer nem megfelelő például arra, hogy eldöntse, vajon az α -hélix másodlagos szerkezeti elem kialakulása során a folyamat hajtóereje vagy csupán kísérő jelensége az intramolekuláris H-kötésrendszerek kialakulása. A konformációs átalakulások végső állapotainak pontos geometriai adatai krisztallográfiai úton meghatározhatók. Az egykristályról készült diffrakciós felvétel alapján nyert geometriai adatok támpontul szolgálhatnak továbbá a folyadék vagy gázfázisú térszerkezeti adatok értelmezésekor.

A fehérjék és a peptidek térszerkezete között szoros kapcsolat van. Ugyanakkor, ha összevetjük a fehérjék diffrakciós adatait az alegységeikre elvégzett NMR-vizsgálatok eredményeivel, kiderül, hogy a fehérjékben mutatott konformációs viselkedés alapján nem feltétlenül következtethetünk a peptidfragmensek térszerkezetére. Például a diffrakciós adatok alapján zömmel α -hélix szerkezetű



5.1. ábra. A mioglobin térszerkezetének sematikus ábrázolása. A térszerkezet főleg helikális másodlagos szerkezeti elemekből épül fel

mioglobin és miohmeritrin helikális részeinek alapos NMR-analízise kiderítette [138a-c], hogy a fehérjében helikális térszerkezetű fragmensek, a mioglobin „H” jelzésű alegysége, valamint a miohmeritrin „A” és „D” fragmenseitől eltekintve, helikális térszerkezetüket vízben lényegében elveszítik. A francia babból izolált plasztocianin térszerkezetét döntően β -redőzött rétegű alegységek építik fel a diffrakciós felvételek tanúsága szerint, ám ugyanezek a polipeptid fragmensek vízben alig őrzik meg ugyanazt a konformációs jellegüket [138d]. Mivel ezekről a fehérjefragmensekről ez idáig

nem készült röntgendiffrakciós alapon szerkezetmeghatározás, lehetséges, hogy a megfigyelt konformációs különbségek a molekuláris környezet eltérő jellegére vezethetők vissza. Ugyanakkor elképzelhető, hogy a peptidfragmensek nem mutatnak olyan konformációs viselkedést, amelyet a fehérvérjékben mutatott konformációs viselkedésük alapján elvárnánk.

Ha a szilárd fázisban a peptidek molekulái meghatározott sorrendben helyezkednek el, akkor a kristályrácsban (az atomokon) szóródó röntgensugarak interferenciája diffrakciós képet eredményez, amely tartalmazza a kristályról nyerhető valamennyi információt. Tehát a diffrakciós kép mind a kristályt felépítő atomok minőségének, mind azok térbeli elhelyezkedésének függvénye. Az interferencia maximumok vagy más szóval reflexiók mérése során azonban az információ egy részét óhatatlanul elveszítjük, mivel a jelintenzitások mérhetők csupán, míg azok fázisa nem rögzíthető. Noha a diffrakciós kép és a kristályrácsot felépítő atomok elektronsűrűségi térképe közötti összefüggés Fourier-transzformáció segítségével kifejezhető, a diffrakciós felvétel ismeretében mégsem lehet az elektronsűrűségi térképet közvetlenül számítani. Az „elvezett fázis”, amely a krisztallográfia központi problémája, nem teszi lehetővé a meghatározást, csak ha adott számú kezdeti fázist már ismerünk. A kezdeti, még pontatlanul meghatározott elektronsűrűség alapján számítható diffrakciós képet összevetjük a mért diffrakciós képpel, majd az elektronsűrűségi függvényt iteratív úton finomítjuk. Az eljárás során a fázisadatok egyre pontosabb meghatározására nyílik lehetőség, amely során egyre több szerkezeti információ ismerhető meg.

A „rivális” NMR-spektroszkópiai módszertől eltérően, a röntgenkrisztallográfiai mérések során nem a molekulában lévő hidrogénatomok, hanem a nehézatomból relatív térbeli elhelyezkedése alapján határozzák meg a szerkezetet. Sőt, eltekintve a neutrondiffrakciós alapokon nyugvó szerkezetektől (mint pl. a mioglobinnal 2MB5 diffrakciós képe), a protonok térkoordinátáit nem mérések alapján határozzák meg. Ennek az az oka, hogy a szórt röntgensugárzás intenzitásához az egyes atomok az elektronsűrűségeikkel arányosan járulnak hozzá, ezért a hidrogénatomokon elhajló sugárzás intenzitása csak nagyon pontatlanul mérhető.

5.1. PEPTIDEK SZILÁRD FÁZISÚ SZERKEZETE

Ha a peptidek molekulái translációk és szimmetria-transzformációk által meghatározott rendben helyezkednek el, akkor a rácssíkokról elhajló röntgensugarak interferenciapontokat (diffrakciós képet) hoznak létre. (Ezek az interferenciapontok a hőmozgás hatására kisebb-nagyobb kiterjedésű foltokként jelennek meg.) Ha elegendő számú koherens rácssík építi fel a kristályt, azaz egykristályról beszélünk, akkor az interferenciapontok intenzitása mérhetővé válik. Ez az interferenciamaximumokból álló háromdimenziós felvétel minden információt tartalmaz a kristály belső felépítéséről, mivel a reflexiók intenzitása mind a kristályt alkotó atomok minőségének, mind azok elhelyezkedésének a függvénye. A fázissal rendelkező szórási amplitúdókat szerkezeti tényezőknak vagy struktúrfaktoroknak ($F[hkl]$) szokták hívni, mely a következőképpen definiálható:

$$F(hkl) = \sum_{n=1}^N f_n(hkl) \exp 2\pi i (hx_n + ky_n + lz_n) = |F(hkl)| \exp i \alpha(hkl). \quad (5.1)$$

A $[hkl]$ egész számokból felépülő számhármassok a kristályrác síkjait azonosítják (Miller-index), míg $f_n(hkl)$ az atomi szórás-tényező. Az x_n, y_n, z_n a kristályrác elemi cellájának egy atomjához rendelhető helyvektor, ahol n az $1 \leq n \leq N$ tartományba esik, mivel N az elemi cella aszimmetrikus egységében lévő atomok száma. A szerkezeti tényező fázisának $\alpha(hkl)$ meghatározása tehát alapvető probléma a struktúrfaktorok kiszámítása során. Jelölje $\varrho(x, y, z)$ folytonos függvény az elektronsűrűséget az elemi cella egy (x, y, z) pontjában, amely segítségével az (5.1) egyenlet a következő formába írható:

$$F(hkl) = \frac{V}{abc} \int_0^a \int_0^b \int_0^c \varrho(x, y, z) \exp 2\pi i (hx_n + ky_n + lz_n) dx dy dz, \quad (5.2)$$

ahol a, b, c az elemi cella éleinek hosszát, míg V ugyanennek térfogatát jelenti. Az (5.2) egyenlet inverz Fourier-transzformálása alapján megkapjuk $\varrho(x, y, z)$ -t:

$$\varrho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F(hkl) \exp = 2\pi i (hx + ky + lz). \quad (5.3)$$

Ha tehát a szerkezeti tényezők a diffrakciós tér minden egyes $[hkl]$ pontjaiban ismertek, akkor az elektronsűrűség az elemi cella minden pontjában meghatározhatóvá válik. Ehhez viszont ismernünk kell mind a szerkezeti tényezők abszolút értékeit ($|F(hkl)|$), mind azok fázisát $[\alpha(hkl)]$. Eszerint a struktúrfaktor abszolút értéke mellett, amely a mért interferenciapontok intenzitásának négyzetgyökével arányos, azok fázisát is meg kellene határozni. Ez az adat azonban nem mérhető, így a fázis a detektálás során elvész. A kezdeti fázisadatok megadására számos eljárás ismert, amelyek közül a „nehézatom” vagy „izomorf helyettesítés”, az „anomáliás diszperzió”, illetve a „direkt” módszerek a legelterjedtebbek. A szerkezetmeghatározás lépéseit a „legkisebb négyzetek” módszerén alapuló finomítás zárja, amely során a hőmozgási tényezőket is figyelembe vesszük. Ezek alapján egy kezdeti elektronsűrűségi térkép $[\rho(x, y, z)]$ kiszámíthatóvá válik. Kezdetben csak néhány atom helyzete válik világossá, ám később az időközben meghatározott atomok figyelembevételével a fázisok pontossága egyre javul. Az iterációk során a „javulás mértékét” az R -rel jelölt jósági tényező vagy megbízhatósági index mutatja:

$$R = \frac{\sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} \text{abs}\{|F(hkl)^{\text{kísérleti}}| - |F(hkl)^{\text{számított}}|\}}{\sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} |F(hkl)^{\text{kísérleti}}|} \quad (5.4)$$

Kis molekulák esetében a *jósági tényező* (R) a 2–8%-os értékhatárok közé kell eszen [175], amely körülbelül 0,9 Å felbontással párosulva kielégítő minőséget jelent. Fehérjéknél azonban ez az érték az elektronsűrűségi térkép felbontásától is függ, amely $0,71 \lambda (2 \sin \Theta_{\max})^{-1}$ értékével arányos. Itt a λ az alkalmazott monokromatikus röntgensugárzás hullámhossza, míg $(\sin \Theta_{\max})$ a legnagyobb szögérték szinusza, amelyet a Fourier-szintézisben még alkalmazunk. A kismolekulák elektronsűrűségeinek térbeli eloszlása alapján számított geometriák igen pontosak, s így akár ezred Angström nagyságrendű (10^{-13} m) kötőhossz-ingadozások is értelmezhetővé válnak. Bár fehérje méretű molekulák esetében a módszer felbontóképessége és pontossága lényegesen rosszabb (esetenként akár 0,5 Å-ös hibák is adódhatnak), a röntgenkristallográfia még ma is a peptidok és fehérjék szerkezetkutatásának pilléreköve [175, 176a, b].

A széles körben való alkalmazás legfőbb gátja a jó minőségű egykristály előállítása, amely elengedhetetlen, mivel a „jelintenzitás erősítése” magában az egykristályban történik. A metodikai korlátok mellett a következtetések általánosításának legfőbb akadálya az, hogy az egykristály mindig viszonylag nagy számú intermolekuláris kölcsönhatásról tanúskodik. Így valójában csak egy speciális térszerkezetet tudunk meghatározni, ami nem feltétlenül létezik a szolvatált molekulában, vagy ha létezik is, akkor sem biztos, hogy torzítatlan és egyben a legstabilabb konformáció. Krisztallográfusok esetenként arra a következtetésre jutottak, hogy a peptidek szilárd fázisban tapasztalt molekuláris környezete akár modellezheti a peptid-receptor kötődést is [177, 178]. Az utóbbi években bevezetésre került heteronukleáris NMR-technikák eredményei azonban óvatosságra intenek. A ciklosporin ciklofilinhez történő kötődésének tanulmányozása során WEBER és mts. [179], valamint FESI és mts. [180] egymástól függetlenül mutattak rá arra, hogy a receptorhoz kötött ciklosporin térszerkezete teljesen más, mint a szabad molekuláé, mely a röntgenadatok alapján 4 intramolekuláris hidrogénhidat tartalmaz. Kötött állapotban a korábban megfigyelt *cisz* peptidkötés eltűnése mellett, a négy belső H-híd mindegyike megszűnik. Tucatszámra található az irodalomban olyan példák, ahol az oldatfázisú és a szilárd fázisú szerkezet merőben eltérő viselkedést mutat.

KARLE [181], ROSE és mts. [182], AUBRY és mts. [183], BOUSSARD és mts. [184] és mások szisztematikus munkájának köszönhetően ma több száz peptid szilárd fázisú térszerkezete ismert. A legegyszerűbb peptidek, amelyek mindössze egyetlen királis vagy akirális aminosav diamidjai (5.1. táblázat), leggyakrabban a nyújtott (β_L) vagy az enyhén csavart (ϵ_L) konformációt veszik fel. Noha a H-Xxx-Yyy-OH típusú szerkezetek is rejthetnek konformációs érdekességeket (pl. H-Pro-L-Leu-OH [185]), nagyobb érdeklődés mutatkozott a védett dipeptidek (PCO-Xxx-Yyy-NHQ) tanulmányozása iránt, amelyek közül összeválogattunk a teljesség igénye nélkül néhányat (5.2. táblázat). Ezek a molekulák már két összekapcsolt aminosavat tartalmaznak, amely esetben a konformációs sokrétőség már a szilárd fázisú analízis alapján is világossá válik. A röntgenkrisztallográfia segítségével megállapított szerkezetek jól tükrözik azt az elképzelést, hogy esetenként igen hasonló molekulák eltérő térszerkezetet is felvehetnek. A polipeptidlánc hosszának növekedésével a lineáris peptidek konformációs mozgékonyága

5.1. táblázat

Aminosavszármazékok (diamidok) röntgenkristallográfia segítségével meghatározott térszerkezetének gerinckonformációs adatai

Aminosav-rész	N-terminál	C-terminál	φ^a	ψ	Konf. típus	Hivatkozás
Gly	Me-CO-	-NH- ¹ Pr	-78	160	ε_L	200
Gly	¹ Bu-CO-	-NH- ¹ Pr	-112	142	ε_L	201
Gly	¹ Pr-CO-	-NH- ¹ Pr	-169	175	β_L	202
L-Met	Me-CO-	-NMe ₂	-126	162	β_L	203
DL-Val ^b	Me-CO-	-NMe ₂	-92(-90)	123(122)	ε_L	204
L-Val	Me-CO-	-NMe ₂	-132	77	δ_L	205
DL-Leu	Me-CO-	-NH-Et	-91	144	ε_L	206
DL-Leu	Me-CO-	-NH-Et	-91	144	ε_L	183
L-Gln	¹ Bu-CO-	-NH-Me	-72	165	ε_L	207
L-Ser	¹ Bu-CO-	-NH-Me	-92	151	ε_L	208

^a A torziószögek fokokban vannak megadva.

^b Az elemi cellában két különböző geometriájú molekula található.

megnő, aminek következtében a szilárd fázisú méréshez szükséges egykristály előállítása egyre nehezebb feladattá válik. Kristallográfiai módszerek segítségével néhány esetben eredményesen tanulmányozhatók a tripeptid méretű molekulák is, mint például az Ac-Pro-Gly-Phe-OH [186] vagy a Boc-Pro-D-Ala-Ala-OH [187]. Speciális aminosavszekvenciák esetében pentapeptidekből is növeszthetők rendezett egykristályok, amelyre jó példa a ¹Boc-Ala-(R)-Iva-Ala-(R)-Iva-Ala-OH (Iva = izovalin) [188] amely ideális 3_{10} -helix konformációt vesz fel szilárd fázisban. (Összefoglaló tanulmány [182].) A $(2 \cdot 7) + 1 = 15$ aminosavat tartalmazó Boc-Val-Ala-Leu-Aib-Val-Ala-Leu-Aca-Val-Ala-Leu-Aib-Val-Ala-Leu-Me molekula, amelyben két 7 aminosavból álló ismétlődő alegységet egy amino-kapronsav köt össze, két helikális részre tagolható a szilárd fázisú analízis alapján [189].

Hosszabb peptidek oldatfázisú rendszerei jellegzetesen dinamikus egyensúlyban lévő különböző konformerek keveréke. Noha bizonyos molekulák egyensúlyi rendszerei speciális körülmények között viszonylag kevés gerinckonformert tartalmaznak, az azonosított szerkezetek között gyakoriak a nyitott gerinckonformációjú struktúrák. [A peptidgerinckben egymást követő négy alfa szénatom

($C_i^\alpha, C_{i+1}^\alpha, C_{i+2}^\alpha, C_{i+3}^\alpha$) relatív térbeli helyzetét jól kifejezi a τ szög értéke, mely ha $\tau(C_i^\alpha, C_{i+1}^\alpha, C_{i+2}^\alpha, C_{i+3}^\alpha) > \pm 90^\circ$ vagy $\tau(C_i^\alpha, C_{i+1}^\alpha, C_{i+2}^\alpha, C_{i+3}^\alpha) < -90^\circ$, akkor a gerinckonformáció nyújtott jellegű, míg ha $-90^\circ \leq \tau(C_i^\alpha, C_{i+1}^\alpha, C_{i+2}^\alpha, C_{i+3}^\alpha) \leq +90^\circ$ szög tartományon belül esik, akkor a peptidgerinc erősen hajlított.] Lineáris peptidok esetében a nyújtott, illetve a hajlított gerinckonformerek aránya csak nehezen módosítható, míg gyűrűs peptidok esetében a molekula konstitúciójából következően csupán hajlított gerinckonformáció típus azonosítható. A korlátozott konformációs mozgékonyság miatt, amely összefüggésben van a vegyületek megnövekedett „egykristály-képző” jellegével, számos ciklopeptid röntgenszerkezete ismert.

A ciklodipeptidok vagy diketopiperazinok (szisztematikus nevükön dioxopiperazin-származékok) már a század első évtizedeiben ismertté váltak. Jól kristályosodó vegyületek [190, 191], s ezért számos szerkeze tről kristallográfiai adatok is rendelkezésünkre állnak. Noha különböző tagszámú, természetes, valamint nemtermészetes aminosavakat is tartalmazó ciklopeptidok {*ciklo*[Pro- β -Ala-Pro- β -Ala] [192], *ciklo*[Pro-Phe- β -Ala- β -Ala] [193], *ciklo*[Pro-Pro-Phe- β -Ala- β -Ala] [194] és mások} szilárd fázisú konformációs adatai is ismertek, a legtöbbet a ciklopenta-, valamint a ciklohexa-peptidekkel foglalkoztak. Csupán GIERASCH és munkatársai az elmúlt néhány évben több tucat ciklopeptidet szintetizáltak, amelyek közül számos szilárd fázisú konformációanalízise is elkészült. Míg a ciklopentapeptidok szerkezetükből következően egy β - és egy γ -turn konformációs alegységet is tartalmazhatnak, addig a ciklohexapeptidok két β -kanyar részre oszthatók fel [195]. Még néhány szimmetrikus szekvenciájú ciklohexapeptid esetében is, ahol joggal elvárnánk a konstrukció jellegéből fakadóan a C_2 szimmetriát [pl: *ciklo*(Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly)], annak sérülését figyelhetjük meg részben a prolin-izoméria jelensége, részben a kristályos állapotban tapasztalható kölcsönhatások miatt. Más esetekben a β -kanyar jelentős torzulását figyelhetjük meg. Bizonyos kvázihexapeptidok esetében a konstitúciós C_2 szimmetria szándékos elhagyása [(pl. *ciklo*(Gly-Pro-Ser(O^tBu)-Gly- δ -Ava)] vezetett a gyakorlatilag ideális konformációjú β -kanyar modellvegyület megalkotásához [196] (5.3. táblázat). Míg ebben az esetben (*ciklo*[δ -Ava-Gly-Pro-Ser(O^tBu)-Gly]) (5.2. ábra) a molekula -Pro-Ser- szekvencia jól közelíti az ideális I típusú β -turn gerinckonformációját, addig a *ciklo*[δ -Ava-Gly-Pro-Thr(O^tBu)-Gly]

5.2. táblázat

Védett dipeptidok (triamidok) röntgenkristallográfiai módszerrel meghatározott térszerkezetének gerinckonformációs adatai

Aminosav-rész	N-terminál	C-terminál	φ_1^{a}	ψ_1	φ_2	ψ_2	β -turn	Konf. típus	Hivatkozás
-Pro-Gly-	¹ BuCO-	-NH-Me	-71	+157	-76	+175	-	$\varepsilon_L \varepsilon_L$	209
-Pro-Ala-	¹ PrCO-	-NH- ¹ Pr	-59	+136	+66	+14	II	$\varepsilon_L \alpha_D$	210
-Pro-D-Ala-	¹ PrCO-	-NH- ¹ Pr	-62	+137	+96	+3	II	$\varepsilon_L \alpha_D$	210
-Pro-Asp-	¹ BuCO-	-NH-Me	-57	+134	+59	+26	II	$\varepsilon_L \alpha_D$	211
-Pro-Asn-	¹ BuCO-	-NH-Me	-59	+138	+66	+11	II	$\varepsilon_L \alpha_D$	211
-Pro-Asp(OMe)-	¹ BuCO-	-NH- ¹ Pr	-66	-20	-91	+6	I	$\alpha_L \delta_L$	211
-Pro-His-	¹ BuCO-	-NH-Me	-63	-22	-70	-20	I	$\alpha_L \delta_L$	184
-D-Ala-Pro-	¹ BuCO-	-NH- ¹ Pr	+60	-140	-89	+9	II'	$\delta_D \gamma_L$	212
-D-Ala-D-Pro-	¹ BuCO-	-NH- ¹ Pr	+64	-152	+83	+9	II'	$\delta_D \delta_D$	213
-Gly-Pro-	¹ BuCO-	-NH-Me	-79	+174	+85	-22	—	$\varepsilon_L \alpha_L$	214
-Pro-Gly-	¹ BuCO-	-NH- ¹ Pr	-64	+137	+84	-156	—	$\varepsilon_L \alpha_L$	214
-Ala-Pro-	¹ PrCO-	-NH- ¹ Pr	-129	+76	+76	-22	VIa	$\delta_L \alpha_L$	215
-Gly-Gly-	¹ BuCO-	-NH- ¹ Pr	-69	-25	-89	+3	II	$\alpha_L \alpha_L$	216
-Ala-Gly-	¹ BuCO-	-NH- ¹ Pr	-68	+132	-83	+2	VIa	$\varepsilon_L \alpha_L$	217
-Pro-Thr-	¹ BuCO-	-NH-Me	-66	-22	-103	+7	I	$\alpha_L \gamma_L$	218
-Pro-Pro-	¹ BuCO-	-NH-Me	-60	+138	-95	-7	VIa	$\varepsilon_L \alpha_L$	219
-Pro-D-Pro-	¹ BuCO-	-NH-Me	-58	+134	+83	-7	II	$\varepsilon_L \alpha_D$	219
-Pro-Pro-	¹ BuCO-	-NH-Me	-60	+138	-95	-7	VIa	$\varepsilon_L \alpha_L$	220
-Pro-Cys(Me)-	¹ BuCO-	-NH-Me	-61	+132	+62	+17	II	$\varepsilon_L \alpha_D$	220

-Pro-Phe-	'BuCO-	-NH-Me	-64	+139	+62	+23	II	$\epsilon_1\alpha_D$	220
-Pro-Tyr-	'BuCO-	-NH-Me	-59	+137	+73	+9	II	$\epsilon_1\alpha_D$	220
-Pro-D-Tyr-	'BuCO-	-NH-Me	-64	+137	+73	+9	II	$\epsilon_1\alpha_D$	220
-Pro-Ser-	'BuCO-	-NH-Me	-60	-30	-75	-11	I	$\alpha_1\alpha_L$	221
-Pro-D-Ser-	'BuCO-	-NH-Me	-59	+133	+76	+8	II	$\epsilon_1\alpha_D$	221
-Pro-D-Ser-	'BuCO-	-O-Me	-64	-29	+76	+17	—	$\alpha_1\alpha_D$	221
-Asn-Pro ^b	'BuOCO-	-O-Bzl	-61	+152	-71	+141	—	$\epsilon_1\epsilon_L$	222
-Pro-Ser-	'BuOCO-	-NHMe	-81	-13	-117	+118	—	$\alpha_L\gamma_1$	143
-Val-Ser-	'BuOCO-	-NHMe	—	—	+	—	—	$\alpha_1\delta_L$	223
-Cys-Ala ^c	'BuOCO-	-OMe	-135	+161	-95	+148	—	$\beta_1\epsilon_L$	224
-Pro-D-Ala-	'BuOCO-	-OH	-75	-13	+149	-161	—	$\alpha_L\beta_1$	187

^a A torziózögértékek fokokban vannak megadva.

^c A molekula egy diszulfidhidas dimer: bis (Boc-Cys-Ala-OMe)

5.3. táblázat

A Piv-Pro-Ser-NHCH₃ (1) [221], Boc-Pro-Ser-NHCH₃ (2) [143] Boc-Val-Ser-NHCH₃ (3) [223], *ciclo*[δ -Ava-Gly-Pro-Ser(O^tBu)-Gly] (4) [148] és *ciclo*[δ -Ava-Gly-Pro-Thr(O^tBu)-Gly] (5) molekulák β -turn részének gerinckonformációs adatai

	1	2	3	4	5
φ_{i+1}	-59,8	-80,9	-65,7	-63,3	-60,0
ψ_{i+1}	-27,9	-13,2	-37,6	-23,2	-30,0
φ_{i+2}	-75,0	-116,9	-87,0	-96,2	-90,0
ψ_{i+2}	-11,0	+111,7	-26,4	+4,7	-11,9
^a					
$\Delta\left(\sum_{i=1}^3\right)$	9,1	21,5	5,4	5,4	0,0
$\Delta\left(\sum_{i=1}^4\right)$	9,6	45,6	10,7	5,3	3,0

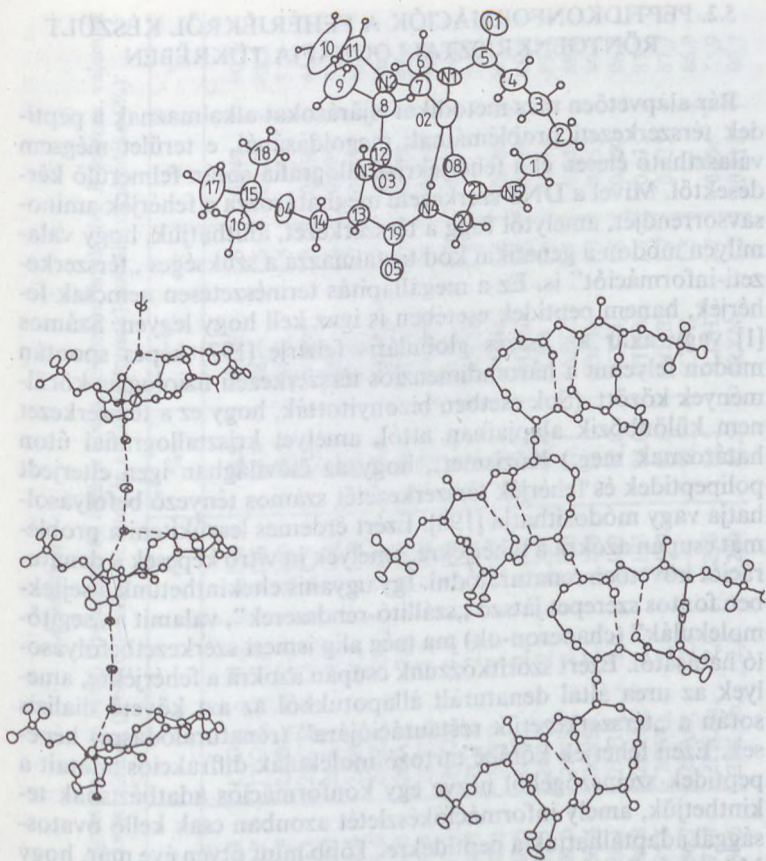
^a $\Delta\left(\sum_{i=1}^n\right)$ a következő módon számítjuk a mért (torsion_{*i*}) és a referenciaként (torsion_{*i*}^{ref}) felhasznált torziószögadatok alapján az ideálistól való eltérést:

$$\sum_{i=1}^n |\text{torsion}_i - \text{torsion}_i^{\text{ref}}| \cdot \frac{1}{n}$$

Az első esetben ($n=3$) a φ_{i+1} , ψ_{i+1} és φ_{i+2} torziószögek eltéréseit vesszük csak figyelembe, míg a második esetben ($n=4$) a β -kanyar „összes” gerinckonformációs torziószögét (φ_{i+1} , ψ_{i+1} , φ_{i+2} és ψ_{i+2}) beszámítjuk az ideálistól vett eltérés meghatározásába.

-Pro-Thr- részletének torziósszögei tizedfok pontosságú egyezést mutatnak a Venkatachalam-féle φ_{i+1} , ψ_{i+1} és φ_{i+2} értékekkel.

Bár a lineáris és gyűrűs peptidekről készített röntgenkrisztallográfiai felvételek nagynértékben hozzájárultak a konformációs alaptulajdonságok mélyebb megismeréséhez, a peptidek legfőbb jellegzetességét, a mozgékonyt és a konformációs egységnyok problémájának megértését csak részben segítették elő.



5.2. ábra. A ciklo[δ -Ava-Gly-Pro-Ser(O^tBu)-Gly] molekula röntgendiffrakciós képe (A), valamint a szilárd fázisra jellemző intermolekuláris hidrogénhidak rendszerét bemutató ábrarészletek (B és C). Az egykristály aszimmetrikus egységében két intra-, valamint három intermolekuláris hidrogénkötés-rendszer azonosítható. Az utóbbiak közé tartozik az a kettő, amelyben a molekula β -turn részéhez kapcsolódó két vízmolekula is részt vesz

5.2. PEPTIDKONFORMÁCIÓK A FEHÉRJÉKRŐL KÉSZÜLT RÖNTGENKRISZTALLOGRÁFIA TÜKRÉBEN

Bár alapvetően más metodikai eljárásokat alkalmaznak a peptidok térszerkezeti problémáinak megoldásánál, e terület mégsem választható élesen el a fehérjekrisztallográfia során felmerülő kérdésektől. Mivel a DNS szerkezete meghatározza a fehérjék aminosavsorrendjét, amelytől függ a térszerkezet, állíthatjuk, hogy valamilyen módon a genetikai kód tartalmazza a szükséges „térszerkezeti-információt” is. Ez a megállapítás természetesen nemcsak fehérjék, hanem peptidok esetében is igaz kell hogy legyen. Számos [1] vagy akár az összes globuláris fehérje [197] képes spontán módon felvenni a háromdimenziós térszerkezeti fiziológiás körülmények között. (Sok esetben bizonyították, hogy ez a térszerkezet nem különbözik alapjaiban attól, amelyet krisztallográfiai úton határoznak meg.) Közismert, hogy az élővilágban igen elterjedt polipeptidek és fehérjék térszerkezetét számos tényező befolyásolhatja vagy módosíthatja [198]. Ezért érdemes leszűkíteni a problémát csupán azokra a fehérjékre, amelyek *in vitro* képesek a denaturációt követően renaturálódni. Így ugyanis eltekinthetünk a sejtekben fontos szerepet játszó „szállító-rendszerek”, valamint a „segítő-molekulák” (chaperon-ok) ma még alig ismert szerkezetbefolyásoló hatásától. Ezért szorítkozzunk csupán azokra a fehérjékre, amelyek az urea által denaturált állapotukból az azt követő dialízis során a „térszerkezetük restaurációjára” (renaturálódásra) képesek. Ezen fehérjék körébe tartozó molekulák diffrakciós adatait a peptidok szemszögéből nézve egy konformációs adatbázisnak tekinthetjük, amely információkészletét azonban csak kellő óvatossággal adaptálhatjuk a peptidokra. Több mint ötven éve már, hogy MIRSKY és PAULING [199] először felvetették ilyen kérdéseket, ám a kielégítő válasz még várat magára.

Elsősorban olyan fehérjék térszerkezetére vonatkozó krisztallográfiai adatokat érdemes a peptidkonformáció szemszögéből analizálni, amelyek más molekuláktól elkülönített állapotban is stabil térszerkezeti viselkedést mutatnak. (Ezen tulajdonság egyik ismérve lehet a fokozott renaturációs készség.) Fontos továbbá, hogy a felhasznált térszerkezeti adatok megbízható és kielégítő pontosságú diffrakciós feltételekből származzanak (5.4. táblázat). Közismert, hogy a globuláris fehérjék egy jelentős hányadának másodlagos szerkezetét a jólismert periodikus másodlagos szerkezeti ele-

5.4. táblázat

A BPSD-ből (Brookhaven Protein Structure Data bank) kiválasztott 66 fehérje kódja, felbontási értéke (r), R faktora, valamint a közismert másodlagos szerkezeti elemek (α -hélix, β -redőzött réteg és a β -turn típusok) százalékos járuléka (%)

r	R	%	r	R	%	r	R	%
1BP2, 1,7	0,171	89,3	ITGS, 1,8	0,186	84,9	2RHE, 1,6	0,149	90,3
1CC5, 2,5	0,290	69,7	1TGSi, 1,8	0,186	84,9	2SGA, 1,5	0,126	88,3
1CCR, 1,5	0,190	87,9	2ABX, 2,5	0,240	14,5	2SNS, 1,5	—	57,1
1CTF, 1,7	0,174	95,1	2ACT, 1,7	0,171	87,4	2SOD, 2,0	0,256	65,4
1ECA, 1,4	—	95,0	2ALP, 1,7	0,131	86,4	351C, 1,6	0,195	91,3
1FC2, 2,8	—	78,6	2APP, 1,8	0,136	90,4	3C2C, 1,7	0,175	81,2
1FC2d, 2,8	—	78,6	2AZA, 1,8	0,157	90,4	3DFR, 1,7	0,152	86,9
1FDX, 2,0	—	80,0	2CAB, 2,0	0,193	88,4	3ICB, 2,3	0,178	92,4
1GCR, 1,6	0,230	89,5	2CCY, 1,7	0,188	92,7	3PGM, 2,8	0,290	48,3
1HIP, 2,0	0,240	81,1	2CDV, 1,8	0,176	87,1	3RP2, 1,9	0,191	84,8
1HMQ, 2,0	0,173	89,7	2CTS, 2,0	0,161	88,5	3RXN, 1,5	—	78,0
1LH1, 2,0	—	95,0	2CYP, 1,7	0,202	92,9	3SGBc, 1,8	0,125	86,4
1LZ1, 1,5	0,177	88,0	2EST, 2,5	0,210	85,2	3SGBi, 1,8	0,125	86,4
1LZT, 2,0	0,254	83,5	2GN5, 2,3	0,217	44,6	3TLN, 1,6	0,213	89,7
1IMBD, 1,4	—	92,0	2INSA, 2,5	0,180	81,1	4APE, 2,1	0,158	89,2
1INXB, 1,4	0,240	60,4	2INSb, 2,5	0,180	81,1	4DFR, 1,7	0,155	89,2
1PCY, 1,6	0,170	88,1	2LHB, 2,0	0,142	92,0	4FXN, 1,8	0,200	86,0
1PP2, 2,5	0,178	86,8	2LZM, 1,7	0,193	94,0	4HHBa, 1,7	0,135	87,7
1PPD, 2,0	0,145	85,6	2OVO, 1,5	0,199	91,8	4HHBb, 1,7	0,135	87,7
1PPT, 1,4	—	86,7	2PAD, 2,8	—	74,3	5CPA, 1,5	—	86,9
1SBT, 2,5	—	73,7	2PKAa, 2,0	0,220	82,5	5LDH, 2,7	0,196	55,9
1SN3, 1,8	—	88,5	2PKAb, 2,0	0,220	82,5	5RXN, 1,2	0,115	90,7

mek alkotják. Bár ez a százalékos érték (%) esetenként akár 95% körül is mozoghat (1CTF, 1ECA, 1LH1), más fehérjék esetében az 50%-os értéket sem éri el (2GN5, 3PGM), sőt a 2ABX jelű fehérje esetében a „rendezettnek” ítélt szerkezetek aránya 15% alatt marad. Mindez arra enged következtetni, hogy bizonyos fehérjék esetében a térszerkezet egy jelentős hányadát a „klasszikus” periodikus—aperiodikus kategorizálás értelmében „rendezetlennek” vagy aperiodikusnak kell minősítenünk. Ez némiképp félrevezető, mivel azok a szekvenciális domének, amelyek térszerkezetét nem a periodikus másodlagos elemek építik fel, más osztályozási rendszer szerint jól meghatározott és kategorizálható részekként azonosíthatók (5.5 táblázat). Az 5.4. táblázatban feltüntetett 66 és további fehérje együttes szerkezetanalízisét követően megállapíthatjuk, hogy a korábban definiált α_L , α_D , β_L , δ_L , δ_D , ε_L , ε_D , γ_L és γ_D konformációs kódok segítségével valószínűleg minden fehérje gerincszerkezete leírható (5.3. ábra). Az 5.3. ábra összhangban van az 5.4. táblázat azon kijelentésével, amely szerint a globuláris fehérjék szerkezetének egy jelentős hányada a periodikus másodlagos szerkezeti elemek segítségével kategorizálható. A jól ismert helikális, β -redőzött réteg vagy poli(prolin)-II konformációk, amelyek a megfelelések értelmében α_L (al), α_D (ad), β_L (bl) és ε_L (el) alegységekből épülnek fel, az utóbb említett szerkezetleírás értelmében a vizsgált fehérjemolekulák térszerkezetének 80,1%-át ($39,0\% + 4,4\% + 23,3\% = 80,1\%$) tömörítik. Így ez a közelítésmód összhangban van a köztudatban elterjedt koncepcióval, viszont előnye, hogy a korábban rendezetlennek ítélt szerkezetrészeket osztályozza az ε_D , δ_L , δ_D , γ_L és γ_D alegység-konformációk alapján.

5.3. FEHÉRJÉK TÉRSZERKEZETE A PEPTIDKONFORMÁCIÓK ALAPJÁN

Közel kétszázötven éve, hogy a svéd LINNÉ (1753) kialakította a botanika egységes nevezéktanát, amely kategóriák segítségével ma a növények alaktani tulajdonságaik alapján rendszerbe foglalhatóak, az új egyedek osztályozhatóak, valamint ezek rokonsági foka a már ismert fajtákkal megállapítható. Hasonlóan a botanikusokhoz, a kémikusok és biokémikusok is régóta törekednek egy olyan nomenklatúra kidolgozására, amely a fehérjéket *térszerkezetük* alapján osztályozná. A „3D alakfelismerés” algoritmikusan nem

5.5. táblázat

A 9 jellegzetes gerinckonformáció (α_L , α_D , β_L , δ_L , δ_D , ε_L , ε_D , γ_L , γ_D) előfordulási gyakorisága (A), valamint devianciája (B) 78^a fehérje esetében. (A 78 fehérje közül 66 az 5.4. táblázatban jellemzett, míg a maradék 12-ről „jósági” adatokat^a nem közlünk. Összesen 11 793 aminosavat tartalmaz az adatbázis.)

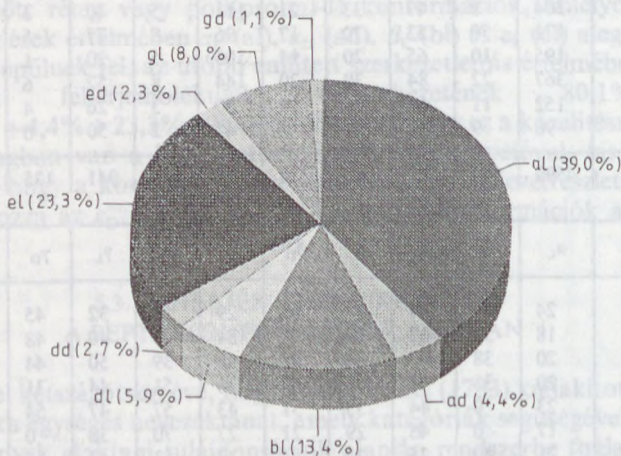
A	α_L	α_D	β_L	δ_L	δ_D	ε_L	ε_D	γ_L	γ_D	totál
GLY	177	277	124	30	30	134	190	16	78	1056
ALA	547	13	110	40	15	203	5	44	7	984
VAL	289	10	159	30	31	229	2	108	2	860
LEU	410	11	84	39	17	221	12	91	5	890
ILE	215	0	87	25	5	132	4	81	1	550
PRO	214	0	2	4	15	288	1	22	0	546
SER	355	19	186	72	30	236	10	53	8	969
THR	256	3	131	62	22	223	8	58	2	765
CYS	112	5	60	21	9	67	2	29	1	306
MET	71	3	29	10	5	37	1	14	1	171
PHE	172	6	78	22	9	97	1	39	0	424
TYR	136	14	94	36	10	130	4	43	0	467
TRP	75	1	33	16	5	47	0	13	0	190
ASP	285	22	42	68	17	118	3	85	11	651
GLU	304	9	47	33	21	111	5	40	3	573
ASN	171	70	53	70	17	96	8	77	5	567
GLN	195	10	65	20	14	105	5	20	1	435
LYS	367	22	84	39	20	144	8	52	6	742
ARG	152	11	61	23	14	80	3	26	4	374
HIS	96	9	52	31	8	45	2	30	0	273
totál	4599	515	1581	691	314	2743	274	941	135	11 793

B	α_L	α_D	β_L	δ_L	δ_D	ε_L	ε_D	γ_L	γ_D	átl.
GLY	24	31	29	37	65	29	50	32	45	38
ALA	18	30	32	34	46	34	71	40	48	39
VAL	20	38	45	37	55	43	39	50	44	41
LEU	20	35	44	33	50	36	51	44	31	38
ILE	23	0	44	33	51	43	57	47	54	44
PRO	17	0	45	29	21	27	70	38	0	36
SER	21	40	35	32	52	33	53	43	44	39
THR	23	45	41	34	58	38	66	48	14	41
CYS	22	35	37	34	52	36	49	48	44	40
MET	21	11	39	42	61	36	51	33	54	39
PHE	22	14	34	31	62	37	49	38	0	36
TYR	23	18	39	32	59	39	64	44	0	40

5.5. táblázat folytatása

B	α_L	α_D	β_L	δ_L	δ_D	ε_L	ε_D	γ_L	γ_D	átl.
TRP	20	60	41	22	40	40	0	40	0	38
ASP	22	21	33	32	47	34	66	37	40	37
GLU	20	34	39	33	50	38	56	38	50	40
ASN	22	18	40	30	56	37	56	43	22	36
GLN	21	37	41	32	50	37	68	43	55	43
LYS	21	32	44	33	54	36	52	41	52	40
ARG	20	26	40	32	56	37	48	46	38	38
HIS	21	14	36	35	46	39	37	44	0	34
átlag	21	30	39	33	52	36	55	42	42	

^a Az 5.4. táblázatban felsorolt 66 fehérje mellett a következő 12 fehérjére ICPV, ICRND, 1FB4I, 1FBJ1, 1FB4h, 1FBJh, 1INSb, 4ADH, 4ATCa, 4ATCb, 4CYT együttese alkotja az adatbázis alapját képező 78 fehérjét. (Az utóbb említett 12 fehérje r., R, valamint a % adatait az 5.4. táblázat nem tartalmazza.)



5.3. ábra. A 9 jellegzetes gerinckonformáció (α_L [al], α_D [ad], β_L [bl], δ_L [dl], δ_D [dd], ε_L [el], ε_D [ed], γ_L [gl] és γ_D [gd]) előfordulási gyakorisága az 5.5 táblázatban feltüntetett 78 fehérje esetében. A leggyakoribb (39%) α_L [al] konformációjú alegységek elsősorban a jobbenetes α -hélixekben, valamint az I és a III típus β -kanyarokban azonosíthatók. A β -redőzött rétegek ismétlődő β_L [bl] részekből, illetve a csavart konformációjú β -rétegek esetén β_L [bl] és ε_L [el] alegységekből épülnek fel

megoldott probléma, azaz a testeket automatikus módon, téralkatuk alapján általában nem tudjuk osztályozni. A fehérjekémia területén kialakult kategóriák világosan tükrözik ezt a bizonytalanságot. Nemcsak hogy a másodlagos szerkezeti elemek definíciója nem pontos, hanem az osztályozás eleve tartalmazza a „nem-tipikus” vagy „rendezetlen” térszerkezeti elemet is, mint gyűjtő kategóriát. Számos kísérlet történt térszerkezet-leíró rendszerek megalkotására, amely közül csak kettőre utalunk vázlatosan. Ez első módszer alapját MM számítások, míg a másodikat topológiai megfontolások képezik, ám közösek abban, hogy egyedül a fehérjékben foglalt *peptidfargemensek térszerkezetei* alapján működnek.

Az aminosavdiamidok MM számításokkal meghatározott konformációs gyakoriságai alapján SCHERAGA és munkatársai már korábban javasolták a Ramachandran-térkép ($\{\varphi, \psi\}$ konformációs felszín) felosztását. A „bal” és a „jobb” felsíkokat nyolc-nyolc konformációs tartományra osztották és az **A, B, C, D, E, F, G, H**, valamint **A*, B*, C*, D*, E*, F*, G*, H*** szimbólumokkal jelölték (részleteiben lásd 6. fejezet). A módszer lehetőséget ad arra, hogy a 16 konformációtípus alapján a fehérjék vagy peptidok gerinckonformációs adatait osztályozzuk. Ez a nevezéktan azonban nem terjedt el széles körben, részben azért, mert sem az alkalmazott elméleti módszerből, sem a peptidok térszerkezete nem indokolja a $2 \cdot 8 = 16$ páronként C_2 -es szimmetriájú kvadránsok létrehozását. Ugyanakkor az alapgondolat ígéretes, mert a gerinckonformációt leíró $\{\varphi, \psi\}$ torziószögek mentén klaszterosodás figyelhető meg.

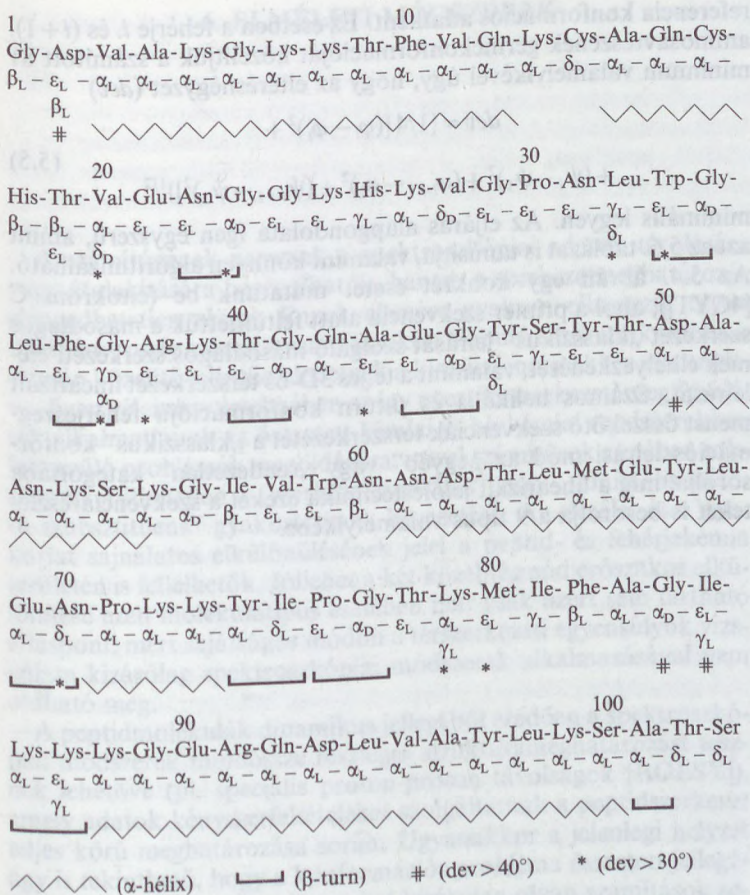
A multidimenzionális konformációanalízis (MKA) segítségével kimutatható (lásd 6. fejezet), hogy egy fehérjének elvileg is csak véges számú térszerkezete lehet. Alkalmazva például a korábban említett másodrendű (vagy dipeptid közelítésmódot) (lásd 1.8. egyenlet) bármely fehérje ismert térszerkezete egyértelműen leírható linearizált formában is. A módszer alkalmazásánál felhasznált „tipikus 9 konformer” pontos $\{\varphi, \psi\}$ értéke tovább finomítható az alkalmazott számítási eljárások javításával vagy a közelítés rendűségének megváltoztatásával, ám ezek az alapgondolatot nem befolyásolják. (A matematikai sorfejtésekhez hasonlóan a konformáció linearizált leírása javul, ha az 1.7. [diamid közelítés] helyett az 1.8. [triamid közelítést] egyenletet alkalmazzuk.) Például az (1.8.) egyenlet figyelembevételével bármely ismert fehérje térszerkezete linearizált formában leírható, ha például az Ac-L-Ala-L-Ala-NHCH₃ MM alapon kiszámított 81 minimumhelyet használjuk

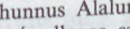
5.6. táblázat

A tonhal (Thunnus Alalunga) redukált citokrom C (4CYT) szekvenciariáslétének térszerkezete (80. aminosavtól a 90. aminosavig). A linearizált leírásmód esetében a 9 konformációs kód (α_L , α_D , β_L , γ_L , δ_L , ϵ_L , δ_D , ϵ_D és ϵ_D) valamelyikét hozzárendeljük a szekvencia megfelelő diamid egységéhez

absz. pozíció	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
rel. pozíció	<i>i</i>	<i>i</i> +1	<i>i</i> +2	<i>i</i> +3	<i>i</i> +4	<i>i</i> +5	<i>i</i> +6	<i>i</i> +7	<i>i</i> +8	<i>i</i> +9	<i>i</i> +10
aminosavtípus	-Met	Ile	Phe	Ala	Gly	Ile	Lys	Lys	Lys	Gly	Glu
φ	-81	-98	-154	-73	+118	-99	-80	-78	-59	-65	-67
ψ_1	+109	+96	+130	-26	+164	+108	-29	+125	-38	-44	-34
konf. kód 1		γ_L	β_L	α_L	α_D	ϵ_L	α_L	ϵ_L	α_L	α_L	α_L
konf. kód 2	ϵ_L	γ_L	β_L	α_L	α_L	γ_L	γ_L	α_L	α_L	α_L	α_L
dev. 1		16	16	48	48	16	16	18	18	6	6
dev. 2		19		10	58	19	19	19	19	9	9
végző azonosítás		γ_L	β_L	α_L	α_D	ϵ_L/γ_L	α_L	ϵ_L/γ_L	α_L	α_L	α_L

Másodrendű közelítést alkalmazva (1.8. egyenlet) összevetettük a szekvencia (*i*, *i*+1) majd az (*i*+1, *i*+2) stb. részben átfedő triamid egységek torziózóértékeit, a referenciaként alkalmazott Ac-L-Ala-L-Ala-NHMe célszerűen megválasztott konformerjének megfelelő torziózóértékével. A referenciaként alkalmazott konformerek (pl. Ac-L-Ala-L-Ala-NHMe) és a vizsgált fehérje „egybévágóságát” az (5.5) egyenletben meghatározott *dev* értékek sorozatával fejeztük ki. Ha egy szekvenciariáslét, mint például az Ile⁸⁵(*i*+5) gerinckonformációs torziózóértékei más azonosítást kapnak annak függvényében, hogy a bal vagy a jobb szomszédal képezett triamid rendszer szerint azonosítjuk ([*i*+4, *i*+5] [*i*+5, *i*+6]), akkor célszerű alternatív jelölést alkalmazni [Ile⁸⁵ → ϵ_L vagy γ_L].



5.4. ábra. A tonhal (*Thunnus Alalunga*) redukált citokrom C (4CYT) primer szekvenciája, valamint másodlagos szerkezete „klasszikus” (\wedge [α -hélix],  [β -turn]) és „linearizált” formájú ($-\alpha_L - \alpha_L - \delta_L - \varepsilon_L - \alpha_D - \varepsilon_L -$) leírása. (Ha egy [sekszió] részlet gerinckonformációs torziószögértékei jelentősen eltérnek a referenciaként alkalmazott szerkezetek megfelelő torziószögértékeitől, akkor célszerűen alternatív jelölést alkalmazhatunk [$\text{Asn}^2 \rightarrow \varepsilon_L$ vagy β_L].)

referencia konformációs adatként. Ez esetben a fehérje i . és $(i+1)$. aminosavrészének gerinckonformációját közelítjük a számított 81 minimum valamelyikével úgy, hogy az eltérésnégyzet (dev)

$$dev = \{1/4[(\varphi_i - \varphi_1)^2 +$$
(5.5)

$$+ (\psi_i - \psi_1)^2 + (\varphi_{i+1} - \varphi_2)^2 + (\psi_{i+1} - \psi_2)^2\}^{1/2}$$

minimális legyen. Az eljárás alap gondolata igen egyszerű, amint azt az 5.6. táblázat is tanúsítja, valamint könnyen algoritmizálható. Az 5.4. ábrán egy konkrét esetet mutatunk be (citokrom C [4CYT]), ahol a primer szekvencia alatt feltüntettük a másodlagos szerkezet „klasszikus” leírását szolgáló másodlagos szerkezeti elemek elhelyezkedését, valamint a teljes 3D-os térszerkezet linearizált leírását. Számos helikális és β -turn konformációjú fehérjeszegmenst összekötő szekvenciák térszerkezetét a „klasszikus” konformációs leírási mód az „egyéb” vagy „rendezetlen” kategóriába sorolja, míg a linearizált jelöléstechnika ezeket a szekvenciárészeket is besorolja a 9 típus valamelyikébe.

6. ELMÉLETI MÓDSZEREK

A számítógépek nemcsak a spektroszkópiai adatok tárolására vagy átalakítására használhatók, hanem a szerkezetmeghatározás elengedhetetlen részei. Ennek ellenére gyakran elhangzik olyan vélemény, mely szerint a számításokon alapuló szerkezetkutatások csupán közelítő jellegűek lehetnek a kísérleti mérésekhez viszonyítva. Ezen vélemény értelmében az így nyert térszerkezeti megfigyelések alkalmatlanok az összetett kémiai és biokémiai rendszerekben felmerülő problémák megoldására, mivel számítások esetében sokszor elkerülhetetlen a „szerkezetcsonkítás” vagy „minimális méretű szubsztituens” gyakorlatának bevezetése. Az elmélet és a gyakorlat sajnálatos elkülönülésének jelei a peptid- és fehérjekémia területén is fellelhetők. Jóllehet a két közelítésmód erőszakos elkülönítése ezen molekulatípus esetében már csak azért sem tartható álláspont, mert sajtószerű módon a térszerkezeti egyensúlyok vizsgálata kizárólag spektroszkópiai módszerek alkalmazásával nem oldható meg.

A peptidmolekulák dinamikus jellegéből eredően a spektroszkópiai módszerek mindössze részleges struktúrameghatározást tesznek lehetővé (pl. speciális proton-proton távolságok [ROESY]), amely adatok kényszerfeltételeket szolgáltatnak a peptidszerkezet teljes körű meghatározása során. Ugyanakkor a jelenlegi helyzet úgy is tekinthető, hogy a konformációs probléma összetett jellegéből fakadóan, peptidszerkezeteket kizárólag olyan számítások segítségével határozhatunk meg, amelyek megfelelő mérésekből származó szerkezeti peremfeltételeken alapulnak. A röntgenkrisztallográfiai eljárások során a molekuláról meghatározott elektronsűrűség térbeli eloszlása, vagy az NMR-spektroszkópia segítségével becsült atomtávolságok egyaránt ilyen szerkezeti peremfeltételrendszernek foghatók fel. Hasonló módon a CD-spektroszkópia alapján feltárt amidcsoportok relatív térbeli helyzete vagy az IR-spektrumokban azonosított funkciócsoportok jellegzetes rezgései mind nélkülözhetetlen szerkezeti adatok, amelyek alapján az elvi-

leg lehetséges, sok tekintetben hasonló konformációk racionálisan leszűkíthetővé válnak. Így az elméleti számítások és a számítógépek nem egyszerűen hasznos segédeszközei a peptidek konformációanalízisének, hanem az eljárások szerves részei.

Elméleti szempontból a peptidek konformációanalízise egy szélsőérték probléma, ahol egy n aminosavból álló polipeptidlánc térszerkezetéhez rendelhető $E = E(\mathbf{x})$ energiafüggvény minimumait keressük, az adott $3N - 6$ dimenziós magkonfigurációs térben. (Az n aminosav N atomból épül fel, amely helykoordinátáit az \mathbf{x} vektor tartalmazza.) Kísérleti adataink kizárólag azon geometriai elrendeződésekhez (konformációkhoz) tartoznak, amelyek a potenciális energia hiperfelszín (PEHF) nulladrendű kritikus pontjaihoz (minimumaihoz) rendelhetők. Ezek a molekula konformerjei. A PEHF minimumaihoz (nulladrendű kritikus pontok, ahol $\lambda = 0$ [lásd később]) tartozó belső koordináták értékei a különböző konformerek geometriai adatait határozzák meg. A PEHF-en található elsőrendű kritikus pontokhoz [$\lambda = 1$] tartozó szerkezetek segítségével viszont a konformerek egymásba alakulásának feltételei tanulmányozhatók. Mind a kísérleti adatokkal történő összehasonlítás, mind a mélyebb megértés szemszögéből nézve döntő fontosságú tehát, hogy milyen elméleti módszer alapján és mekkora pontossággal határozzuk meg a PEHF pontjait, valamint az, hogy hogyan keressük meg a konformációs hiperfelszín kritikus pontjait.

A probléma összetett jellege miatt csak néhány módszer körvonalazására térhetünk ki, mindvégig kizárólag a peptidek sajátos térszerkezeti vonásait szem előtt tartva. Ezért elsősorban (1) a geometria optimalizációs eljárások, (2) az energiaszámolás lehetőségei, valamint (3) a spektroszkópiai alapokon meghatározott peremfeltételek alkalmazhatóságára szorítkozunk.

6.1. SZÉLSŐÉRTÉK-KERESÉSI ELJÁRÁSOK

A számítógépek teherbírásának növekedése napjainkra lehetővé tette, hogy egy molekula geometriai paramétereinek függvényében, a rendszer teljes energiáját ($E_{\text{totál}}$) meghatározzuk. A minimalizációs eljárás szemszögéből nézve másodlagos, hogy milyen elméleti módszer mekkora pontossággal szolgáltatja a molekula teljes energiáját ($E_{\text{totál}}$). Kiszámú független változó mellett a szélsőértékek megtalálása rutin eljárásnak tekinthető. Ugyanakkor a polipepti-

dek konformációanalízise során a legfőbb gondot az jelenti, hogy gyakran több száz vagy esetleg több ezer független változó segítségével leírható potenciális energia hiperfelszín (PEHF) kritikus pontjainak meghatározása a cél. Ezért esetenként már a szóba jövő *minimumok számának* becslése, valamint ezek feltérképezési lehetőségei önmagukban jelentős méretű problémák lehetnek. Több módszer is rendelkezésünkre áll a belső koordináták (x) meghatározására, amelyekhez tartozó $E_{\text{totál}}$ értékének kiszámítása a cél. A „többdimenziós konformációanalízis” kvalitatív módszere (1) mellett, a két legelterjedtebb kvantitatív eljárás a Monte Carlo (2), valamint a hiperfelszínnek következetes meghatározását kísérő analitikus függvényeket illesztő (3) technikák.

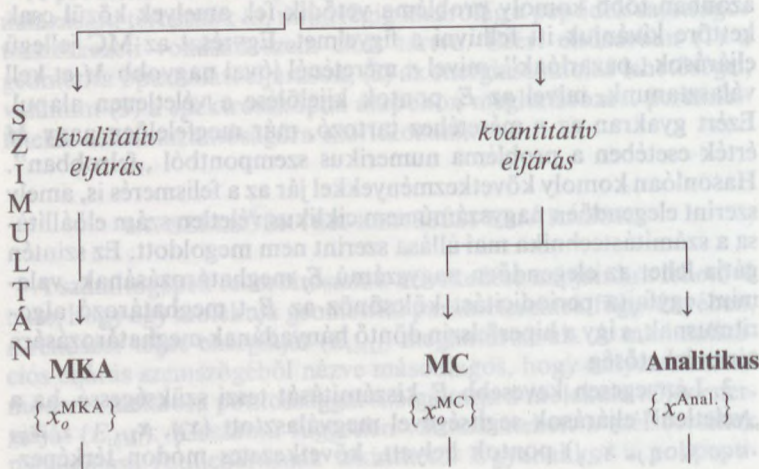
1. A topológiai problémák kvalitatív szinten is kezelhetők, amely során a többdimenziós konformációanalízis egy igen egyszerűen alkalmazható eszköz, amely a PEHF alaktanulmányozása során nagy segítséget nyújthat a szélsőértékek várható környezetének meghatározásában (részleteiben lásd 6.1.1.).

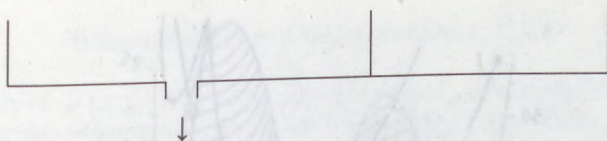
2. A Monte Carlo (MC) eljárások alap gondolata szerint az $E_j = E(x_{1j}, x_{2j}, \dots, x_{ij}, \dots, x_{n-1,j}, x_{n,j})$ függvényértéksereget, ahol n általában több ezer belső koordinátát jelent, véletlenszerűen megválasztott független változó értékek mellett számítjuk ki. Célszerűen ugyanezt az eljárást M esetben megismételjük. Az így kapott $E_1, E_2, \dots, E_j, \dots, E_M$ energiaértékek sorozata elegendően nagy M mellett feltárja a PEHF alakját. A gyakorlatban azonban több komoly probléma vetődik fel, amelyek közül csak kettőre kívánjuk itt felhívni a figyelmet. Egyrészt az MC jellegű eljárások „pazarlóak”, mivel n méreténél jóval nagyobb M -et kell választanunk, mivel az E_j pontok kijelölése a véletlenül alapul. Ezért gyakran az n méretéhez tartozó, már megfelelően nagy M érték esetében a probléma numerikus szempontból „felrobban”. Hasonlóan komoly következményekkel jár az a felismerés is, amely szerint elegendően nagyszámú nem ciklikus véletlen szám előállítás a számítástechnika mai állása szerint nem megoldott. Ez szintén gátja lehet az elegendően nagyszámú E_j meghatározásának, valamint egyfajta periodicitást kölcsönöz az E_j -t meghatározó algoritmusnak, s így a hiperfelszín döntő hányadának meghatározására nincs lehetőség.

3. Lényegesen kevesebb E_j kiszámítását teszi szükségessé, ha a „véletlen” eljárások segítségével megválasztott $(x_{1j}, x_{2j}, \dots, x_{ij}, \dots, x_{n-1,j}, x_{n,j})$ pontok helyett, következetes módon térképez-

zük fel a konformációs hiperteret. (A következetes léptetések sorozatából kialakuló „háló” miatt az irodalomban ezt az eljárást az angolszász név alapján „grid” módszernek hívják.) A felszín módszeres feltérképezése miatt a „független változók elléptetési értéke” célszerűen kicsi kell hogy legyen. (Ez egy „sűrűn” szótt képzeletbeli hálót jelent, amely egy torziósszög jellegű belsőváltozó esetében tipikusan 10° ellépést igényel.) Mivel csak így remélhetjük, hogy a felszín kritikus pontjait „nem ugorjuk át”, ez a közelítésmód még mindig elkerülhetetlenül nagyszámú E_j kiszámolását igényli. Ezt követően a meghatározott PEHF topológiai sajátosságait, a felszínt a lehető legkisebb hiba mellett leíró analitikus függvények analitikus deriváltjain keresztül jellemezzük.

Együttesen a három módszert (1—3) szimultán kritikus pont meghatározó eljárásnak nevezhetjük, mivel a kiválasztott módszer alkalmazását követően egyidejűleg (szimultán) megkapjuk a felületen elhelyezkedő összes kritikus pont közelítő helyét $\{x_o\} = \{x_1^{\lambda=0}, x_2^{\lambda=0}, \dots, x_i^{\lambda=0}, x_1^{\lambda=1}, x_2^{\lambda=1}, \dots, x_j^{\lambda=1}, x_1^{\lambda=k}, x_2^{\lambda=k}, \dots, x_k^{\lambda=1}\}$. Ahhoz, hogy a kritikus pontok pontos helyét is kiszámítsuk (pl. a felszín i darab minimumát; $x_1^{\lambda=0}, x_2^{\lambda=0}, \dots, x_i^{\lambda=0}$), szükséges, hogy a vélelmezett kritikus pontokat egy célszerűen meghatározott eljárással optimáljuk. Ezen eljárás során a kritikus pontokat egymás után határozzuk meg, és ezért ezt konszekutív eljárásnak hívjuk. A szimultán és a konszekutív módszer logikai összefonódását a következő folyamatábrán mutatjuk be:





OPTIMÁLÁS

$$x_1^{\lambda=0}, x_2^{\lambda=0}, \dots, x_i^{\lambda=0}$$

$$x_1^{\lambda=1}, x_2^{\lambda=1}, \dots, x_j^{\lambda=1}$$

$$x_1^{\lambda=k}, x_2^{\lambda=k}, \dots, x_l^{\lambda=k}$$

A fent említett két kvantitatív eljárás bármelyike is eredményezi a felszín egyes pontjait, a kritikus pontokat a hiperfelszín deriváltjain keresztül osztályozhatjuk. Ezeket akár numerikus deriválással, akár a felszínhez illesztett analitikus függvények deriváltjain keresztül tanulmányozhatjuk. A különböző rendű kritikuspontok a megfelelő Hess-mátrix (H_{ij}) negatív sajátértékeinek számával jellemezhetők, ha:

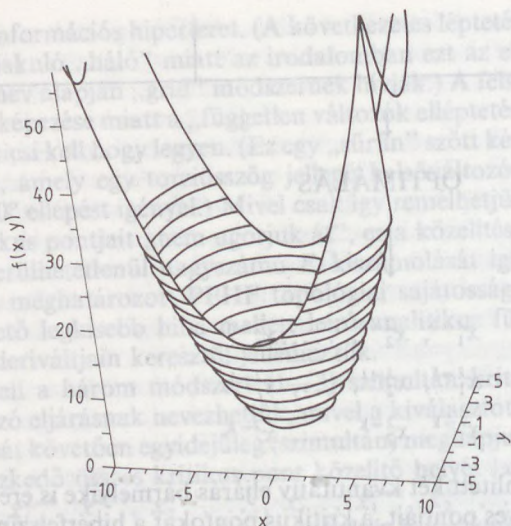
$$H_{ij} = \frac{\partial^2 E}{\partial x_i \partial y_j}, \quad (6.1)$$

ahol $\{x_i, y_i\}$ bármely két belső koordinátája a molekulának. A legegyszerűbb esetet jelentő kétdimenziós PEF esetében például minimumok, nyeregpontok és maximumok azonosíthatók. Egy 2D-PEF egy pontjához rendelhető Hess-mátrix 0 negatív sajátértéket tartalmaz ($\lambda=0$), akkor minimumhelyről, 1 negatív sajátérték esetén ($\lambda=1$) nyeregpontról, míg 2 negatív sajátérték esetén ($\lambda=2$) maximumhelyről szokásos beszélni. Például a következő egyszerű harmonikus potenciál esetében (6.1. ábra)

$$f(x, y) = 0,5x^2 + 0,75y^2 \quad (6.2a)$$

könnyedén meghatározhatjuk az első parciális deriváltakat:

$$\frac{\partial f(x, y)}{\partial x}, \frac{\partial f(x, y)}{\partial y} = \nabla f(x, y) = (x, 1,5y), \quad (6.2b)$$



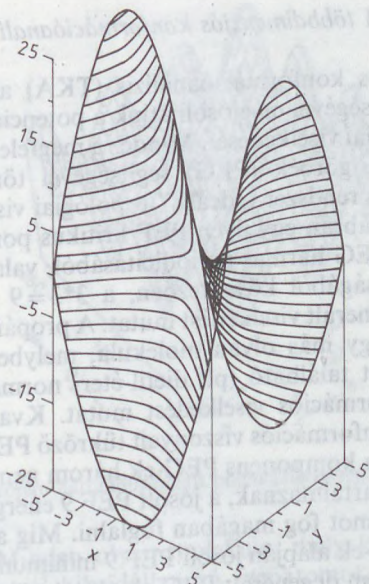
6.1. ábra. Egy harmonikus potenciálenergia-felszín, amelyen egyetlen minimumhely azonosítható. (A függvény analitikus alakja $f(x, y) = 0,5x^2 + 0,75y^2$)

amely alapján a felszín egyes pontjaihoz tartozó gradiensek kiszámíthatók. Az összes második derivált is előállítható, melyek a jelen esetben a (6.2c) egyenletben vannak összefoglalva.

$$H = \begin{vmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1,5 \end{vmatrix} \quad (6.2c)$$

Mivel a negatív diagonális elemek száma (λ) egyenlő zérus ($\lambda = 0$), a 6.1. ábrán látható felszín szélsőértéke egy minimum. Ha a (6.2a) nem egy egyszerű parabola, hanem egy több minimummal rendelkező $f(x, y)$ felszín, akkor a függvény minden kritikus pontjához (ahol is a $\nabla f(x, y) = 0$) a Hess-mátrix más és más numerikus értékei tartoznak.

Egy N dimenziós hiperfelszín esetében minimumhelyről akkor beszélhetünk, ha a Hess-mátrix diagonálisában elhelyezkedő N szám között (6.2c) egyetlen negatív értéket sem találunk, míg maximumról akkor, ha mindegyik elem negatív. Amennyiben mind negatív, mind pozitív diagonális elem számítható, akkor nyeregpontról beszélünk. Természetesen két minimumot vagy maximumot egy PEF-en nyeregpont köt össze, mely a legegyszerűbb eset-

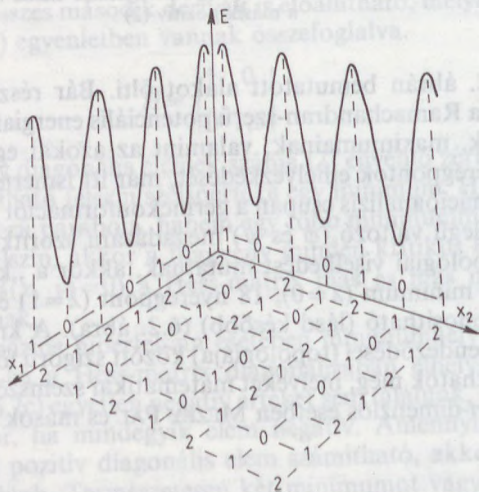


6.2. ábra. Egy elsőrendű nyeregpont potenciális energiafelszíne (analitikus alakja $f(x, y) = x^2 - y^2$), amelyhez tartozó H_{ij} egyik diagonális eleme negatív (-2), míg a másik pozitív (2)

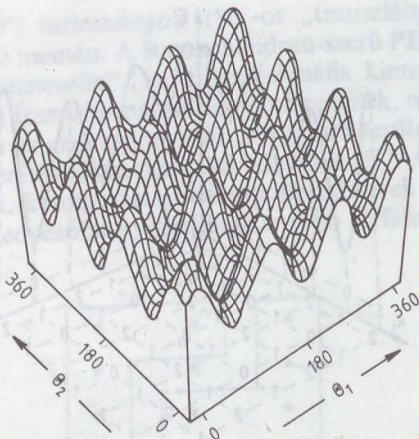
ben a 6.2. ábrán bemutatott alakot ölti. Bár részletesen fogjuk tárgyalni a Ramachandran-szerű potenciális energiafelszín minimumainak, maximumainak, valamint az azokat egymástól elválasztó nyeregpontok elhelyezkedését, már itt ismertjük, hogy ha a konformációanalízis csupán a gerinckonformációt leíró két torziósszög jellegű változó (ϕ és ψ) megadására szorítkozik, amelyek ideális topológiai viselkedést mutatnak, akkor a „konformációs” PEF-en 9 minimum ($\lambda=0$), 18 nyeregpont ($\lambda=1$) és 9 maximum ($\lambda=2$) azonosítható (lásd később) (6.2. ábra). A kritikus pontok térbeni elrendeződései (topológiája) között szigorú törvényszerűségek állapíthatók meg, melyeket matematikai szemszögből nézve az általános n -dimenziós esetben MEZEY PÁL és mások rendszereztek [225, 226].

6.1.1. A többdimenziós konformációanalízis

A többdimenziós konformációanalízis (TKA) az a kvalitatív eszköz, amely segítségével megjósolhatjuk a potenciális energiafelszín (PEF) topológiai viselkedését. Mindez a megfelelő komponens potenciális energia görbék (PEG) segítségével történik, feltéve hogy a molekuláris rendszer „ideális” topológiai viselkedésre utal (6.3. ábra). A 6.3. ábrán egy ilyen PEF kritikus pontjai láthatók, ahol a megfelelő PEG hármass periódicitásából, valamint az energiaértékek azonosságából következően, a $3 \times 3 = 9$ minimumhely energetikailag degenerált viselkedést mutat. A propán két metilcsoportja ($-\text{CH}_3$) vagy más olyan molekula, melyben két ekvivalens $-\text{CH}_3$ -csoport található (pl. dietil-éter, normál bután stb.) ilyen jellegű konformációs viselkedést mutat. Kvalitatív szinten ezen molekulák konformációs viszonyait tükröző PEF-ek hasonlóak (6.4. ábra). Ha a komponens PEG-ek három nem azonos energiájú minimumot tartalmaznak, a jósvolt PEF 9 energetikailag nem degenerált minimumot fog magában foglalni. Míg az energetikailag degenerált PEG-ek alapján jósvolt PEF 9 minimuma energetikailag ekvivalens, a nem degenerált PEG-ek alapján jósvolt PEF minimumainak energiasorrendjére közvetlenül nem becsülhető meg



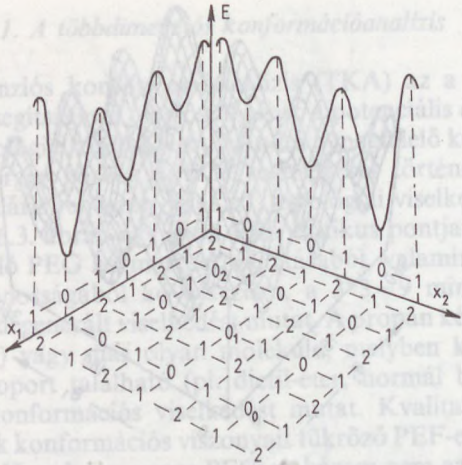
6.3. ábra. A megfelelő háromszorosan degenerált potenciális energiagörbék alapján előállított ideális potenciális energiafelszín kritikus pontjai



6.4. ábra. A propán háromdimenziós potenciális energiefelülete: $E = E(\theta_1, \theta_2)$.

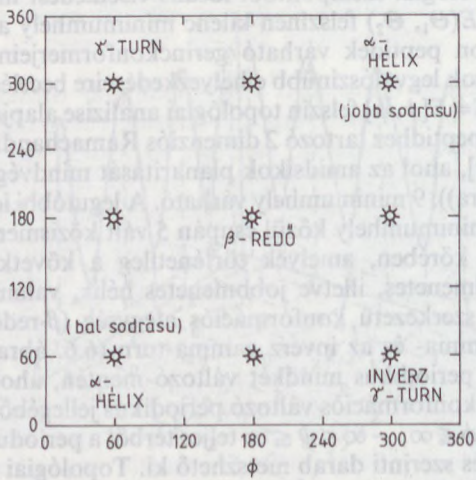
(6.5. ábra). Minden olyan molekula, mely tartalmaz egy királis vagy akirális sp^3 hibridállapotú szénatomot, valamint a korábban említett θ_1 és θ_2 torziósszög jellegű változók értelmezhetők és azok topológiai szempontból ideális viselkedést mutatnak, akkor az $E = E(\theta_1, \theta_2)$ felszínen kilenc minimumhely azonosítható. Ilyen módon peptidiek várható gerinckonformerjeinek számára, valamint azok legvalószínűbb elhelyezkedéseire becslést tehetünk a megfelelő $E = E[\phi, \psi]$ felszín topológiai analízise alapján. Ezért egy egyszerű dipeptidhez tartozó 2 dimenziós Ramachandran-felszínen ($E = E[\phi, \psi]$, ahol az amidcsíkok planaritását mindvégig feltételezzük (6.6. ábra)), 9 minimumhely várható. A legutóbbi időkig ugyanakkor a 9 minimumhely közül csupán 5 vált közismertté a peptid-kémikusok körében, amelyek történetileg a következő neveket kapták; balmenetes, illetve jobbmenetes hélix, valamint nyújtott periodikus szerkezetű konformációs alegység (β -redőzött réteg), illetve a gamma- és az inverz gamma-turn (6.6. ábra). A szóban forgó PEF periodikus változó mentén, ahol a periódus 360° . A két konformációs változó periodikus jellegéből következően a $-\infty \leq \phi \leq \infty$, $-\infty \leq \psi \leq \infty$ teljes térből a periódusnak megfelelően tetszés szerinti darab metszhető ki. Topológiai megfontolások célszerűsítik, hogy a ϕ és ψ értékek 0° és 360° között változzanak, amely a peptidkémiai szokásos $\{-180^\circ \leq \phi \leq 180^\circ$,

A többdimenziós konformációanalízis (TKA) az a kvalitatív eszköz, amely segítségével a potenciális energiáérték-fel-szín (PEF) topológiai jellemzőit vizsgálhatjuk. A PEF a potenciális energiák függvénye, feltéve hogy a molekulák konformációi nem változnak. A PEF felületét a kritikus pontok (6.3. ábra). A kritikus pontok a PEF felületén találhatók, ahol a megfelelő koordináták első deriváltak egyidejűleg nullák. A kritikus pontok energiáit az energiagigéértékek alapján lehet megkülönböztetni. A kritikus pontok energiáinak sorrendje a minimumhelyektől a maximumhelyekig halad. A kritikus pontok energiáinak sorrendje a minimumhelyektől a maximumhelyekig halad. A kritikus pontok energiáinak sorrendje a minimumhelyektől a maximumhelyekig halad.



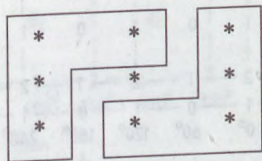
6.5. ábra. Egy ideális potenciálenergia-fel-szín kritikus pontjainak sematikus ábrája, a megfelelő energetikailag nem-degenerált PEG-ek alapján

A dipeptid $-\text{CONH}-\text{CHR}-\text{NHCO}-$ ideálizált PEF-e, ahol az öt triviális minimumhely mellett további négy jelenléte is feltételezhető a TKA alapján. A PEF felületét a kritikus pontok (6.3. ábra). A kritikus pontok energiáit az energiagigéértékek alapján lehet megkülönböztetni. A kritikus pontok energiáinak sorrendje a minimumhelyektől a maximumhelyekig halad. A kritikus pontok energiáinak sorrendje a minimumhelyektől a maximumhelyekig halad. A kritikus pontok energiáinak sorrendje a minimumhelyektől a maximumhelyekig halad.



6.6. ábra. Egy dipeptid $-\text{CONH}-\text{CHR}-\text{NHCO}-$ ideálizált PEF-e, ahol az öt triviális minimumhely mellett további négy jelenléte is feltételezhető a TKA alapján

$-180^\circ \leq \psi \leq 180^\circ$ tartományok 180° -os „transzláltja” mindkét független változó mentén. A Ramachandran-szerű PEF topológiai analízise „szemléletesebb”, ha a tradicionális kimetszés helyett annak lineárisan transzformáltját tanulmányozzuk, mivel a kilenc minimumhely és az ezekhez tartozó „vízgyűjtő-terület” a topológiai célú megjelenítés során nem „szabdalódik fel”. A számítások értelmében az L-konfigurációjú dipeptidrendszerek esetében az energetikailag kedvezőbb minimumok a jobb térfélen helyezkednek el (1. séma)



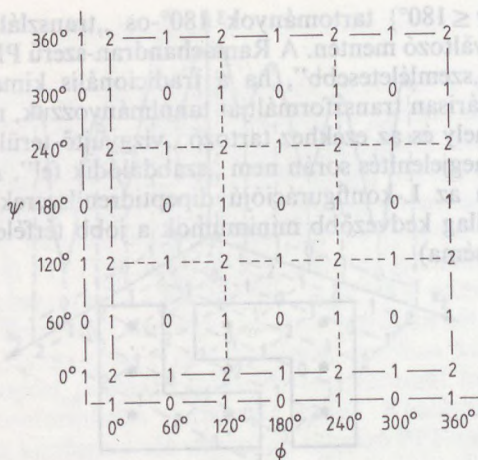
1. séma

Ezért a jobb féltekén elhelyezkedő mezőbe írt minimumok görög szimbólumainak alsóindexe L, míg a megfelelő bal félteke elemei D alsóindexet viselnek. Így a jobbmenetes α -hélix konformációjú periodikus másodlagos szerkezeti elem (amelyet konvencionálisan az angolszász irodalomban α_{RIGHT} -nak vagy röviden α_{R} -nek hívnak) a jelen esetben α_{L} jelölést kap. Ugyanakkor ezen szerkezet konformációs tükörképét az α_{D} szimbólum rövidíti (6.7. ábra). A fehérjékben gyakran található nyújtott vagy β -redőzött rétegként azonosított periodikus szerkezeti elem tipikus konformációs alegysége a β_{L} , amely a „topológiai” Ramachandran-felszín közepésén azonosítható. (2. séma).

γ_{D}	δ_{D}	α_{L}
ε_{D}	β_{L}	ε_{L}
α_{D}	δ_{L}	γ_{L}

2. séma

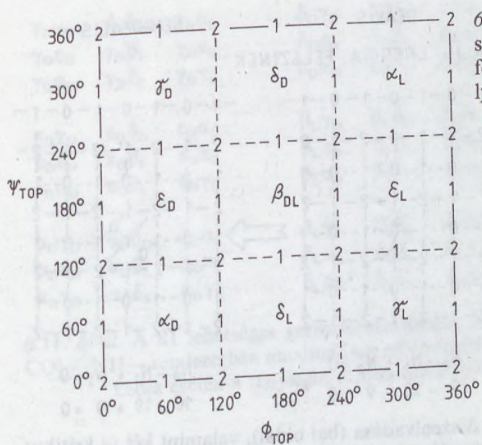
Egyazon molekula esetében a konformációs enantiomereknek (például a γ_{L} és γ_{D}) teljes energiája különböző. Természetesen az



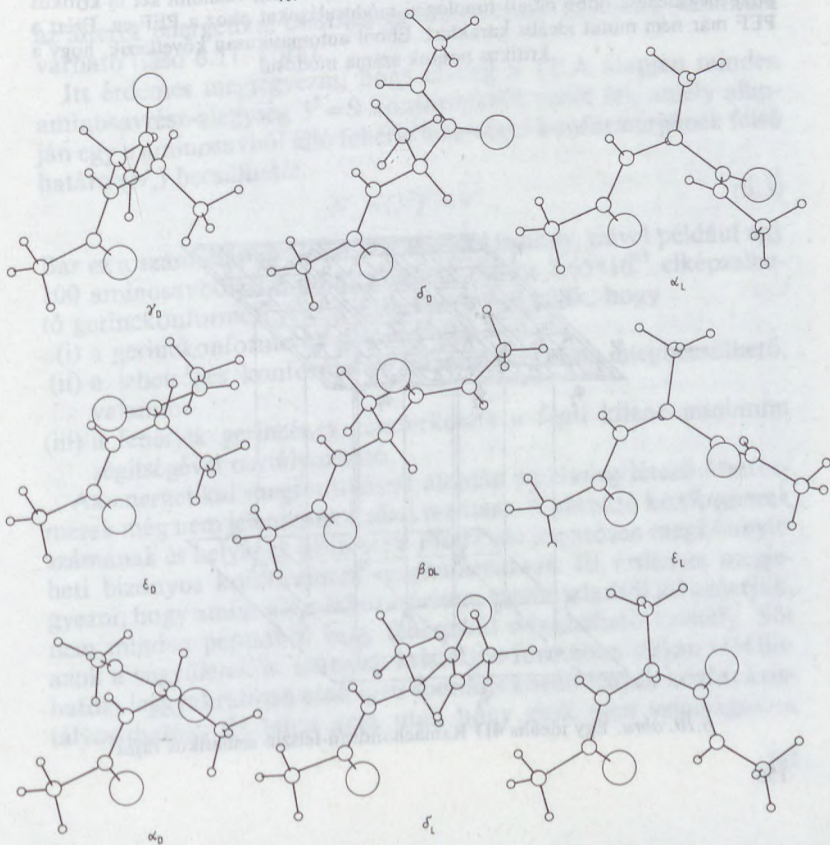
6.7. ábra. A multidimenzionális konformációanalízis által a priori valószínűsített 9 minimum ($\lambda=0$), 18 nyeregpont ($\lambda=1$) és 9 maximum ($\lambda=2$) elhelyezkedése egy 2D Ramachandran-szerű felszínen. A vízszintes és a függőleges szaggatott vonalak a megfelelő „vízgyűjtő” medencéket elválasztó „hegyvonalakat” jelképezik

enantiomer molekulapárok esetében a konformációs enantiomerek azonos energiával rendelkeznek, így például a For-L-Ala-NH₂ molekula γ_L , valamint a For-D-Ala-NH₂ peptid γ_D konformerjéhez azonos energia tartozik. Ezen általános szabályszerűség alól egyetlen kivételt az akirális glicint magában foglaló diamid (pl. For-Gly-NH₂) képez, amely esetben a bal és jobb térrészben található minimumok páronként azonosak; β_{LD} , $\gamma_L = \gamma_D$, $\delta_L = \delta_D$.

Taszítási vagy vonzási kölcsönhatások következtében a PEF bizonyos kritikus pontjai összeolvadhatnak. Ilyen esetekben a potenciálenergia-felszín már nem mutat ideális viselkedést (lásd 6.8. ábra). Amennyiben a diamid rendszer ($-\text{CO}-[\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}]_i-\text{NH}-$) méretnél nagyobb poliamid rendszerek $\text{H}(-\text{CO}-[\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}]_i-\text{NH}_2$ ahol $i=1, 2, 3, \dots, n$) lehetséges gerinckonformerjeinek számát kívánjuk meghatározni, akkor a megfelelő 2^i -en dimenziós PEHF topológiai analízisét kell megcéloznunk (6.10. ábra). Ha a 4D PEHF [$E=E(\phi_1, \psi_1, \phi_2, \psi_2)$] esetén nincs energetikai kölcsönhatás a (ϕ_1, ψ_1) és (ϕ_2, ψ_2) alterek között, akkor a korábbi megfontolások értelmében egy triamid rendszer potenciálenergia hiperfelszínén $(3^2)^2 = 81$ minimumhely, míg



6.8. ábra. Egyetlen diamidegység idealizált potenciális energia felszínén található minimumhelyek. Az ábra átfogja a ϕ és ψ változók két teljes periódusát



$\gamma_D \gamma_D$	$\gamma_D \delta_D$	$\gamma_D \alpha_L$	$\delta_D \gamma_D$	$\delta_D \delta_D$	$\delta_D \alpha_L$	$\alpha_L \gamma_D$	$\alpha_L \delta_D$	$\alpha_L \alpha_L$
$\gamma_D \varepsilon_D$	$\gamma_D \beta_L$	$\gamma_D \varepsilon_L$	$\delta_D \varepsilon_D$	$\delta_D \beta_L$	$\delta_D \varepsilon_L$	$\alpha_L \varepsilon_D$	$\alpha_L \beta_L$	$\alpha_L \varepsilon_L$
$\gamma_D \alpha_D$	$\gamma_D \delta_L$	$\gamma_D \gamma_L$	$\delta_D \alpha_D$	$\delta_D \delta_L$	$\delta_D \gamma_L$	$\alpha_L \alpha_D$	$\alpha_L \delta_L$	$\alpha_L \gamma_L$
$\varepsilon_D \gamma_D$	$\varepsilon_D \delta_D$	$\varepsilon_D \alpha_L$	$\beta_L \gamma_D$	$\beta_L \delta_D$	$\beta_L \alpha_L$	$\varepsilon_L \gamma_D$	$\varepsilon_L \delta_D$	$\varepsilon_L \alpha_L$
$\varepsilon_D \varepsilon_D$	$\varepsilon_D \beta_L$	$\varepsilon_D \varepsilon_L$	$\beta_L \varepsilon_D$	$\beta_L \beta_L$	$\beta_L \varepsilon_L$	$\varepsilon_L \varepsilon_D$	$\varepsilon_L \beta_L$	$\varepsilon_L \varepsilon_L$
$\varepsilon_D \alpha_D$	$\varepsilon_D \delta_L$	$\varepsilon_D \gamma_L$	$\beta_L \alpha_D$	$\beta_L \delta_L$	$\beta_L \gamma_L$	$\varepsilon_L \alpha_D$	$\varepsilon_L \delta_L$	$\varepsilon_L \gamma_L$
$\alpha_D \gamma_D$	$\alpha_D \delta_D$	$\alpha_D \alpha_L$	$\delta_L \gamma_D$	$\delta_L \delta_D$	$\delta_L \alpha_L$	$\gamma_L \gamma_D$	$\gamma_L \delta_D$	$\gamma_L \alpha_L$
$\alpha_D \varepsilon_D$	$\alpha_D \beta_L$	$\alpha_D \varepsilon_L$	$\delta_L \varepsilon_D$	$\delta_L \beta_L$	$\delta_L \varepsilon_L$	$\gamma_L \varepsilon_D$	$\gamma_L \beta_L$	$\gamma_L \varepsilon_L$
$\alpha_D \alpha_D$	$\alpha_D \delta_L$	$\alpha_D \gamma_L$	$\delta_L \alpha_D$	$\delta_L \delta_L$	$\delta_L \gamma_L$	$\gamma_L \alpha_D$	$\gamma_L \delta_L$	$\gamma_L \gamma_L$

6.11. ábra. A 81 lehetséges gerinckonformáció, mely egy $-\text{CO}-[\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}]_2-\text{NH}-$ rendszerben maximálisan előfordulhat. (Nem ideális topológiai viselkedés esetén a tényleges minimumok száma kevesebb mint 81)

az alterek energetikai csatoltsága esetén ennél kevesebb minimum várható (lásd 6.11. ábra).

Itt érdemes megjegyezni, hogy elvileg a TKA alapján minden aminosavrész-alegység $3^2=9$ konformációt vehet fel, amely alapján egy n aminosavból álló fehérje lehetséges konformerjeinek felső határa (N_o) becsülhető:

$$N_o = (3^2)^n = 9^n \quad (6.3)$$

Bár ez a szám már egy kisebb fehérjénél is nagy, mivel például egy 100 aminosavból álló polipeptidlánc esetén $2,65 \cdot 10^{95}$ elképzelhető gerinckonformert jelent, meg kell jegyeznünk, hogy

- (i) a gerinckonformerek száma véges,
- (ii) a lehetséges konformerek maximális száma megbecsülhető, valamint
- (iii) a fehérjék gerincének térszerkezete a fenti kilenc minimum segítségével osztályozható.

Az energetikai megfontolások alapján az elvileg létező konformerek még nem jelentenek fizikai realitást. A várható konformerek számának és helyének ismerete a PEHF-en jelentősen megkönnyítheti bizonyos konformerek meghatározását. Itt érdemes megjegyezni, hogy amint azt a laboratóriumi tapasztalatból jól ismerjük, nem minden peptidből vagy fehérjéből növeszthető kristály. Sőt azok a vegyületek is, amelyek kristályos formában ugyan előállíthatók, leggyakrabban csak igen speciális körülmények között kristályosíthatók. Ez tehát arra utal, hogy csak igen sajtóságos, a

molekula szerkezetével szorosan összefüggő körülmények (adott pH, oldószer, ionerősség stb.) eredményeznek egykristályt. Ez az igen hétköznapi tény összhangban van a (6.3) egyenlet alapján elméletileg is indokolt megfigyeléssel, amely szerint peptidek esetében általában egynél több konformer is lehet termodinamikailag stabil.

A többdimenziós konformációanalízis vázlatos bemutatása is érzékelteti, hogy az eljárás már kvalitatív szintű alkalmazása is eredményezheti a PEHF kritikus pontjainak számszerű becslését. Az itt nem részletezett egyenlőtlenségek segítségével [226] a nem ideális PEHF-eken elvárható minimumainak száma is megbecsülhető. Ha viszont valamilyen úton-módon sejtésünk van már a kritikus pontok hollétéről, akkor azokat célszerűen megválasztott algoritmusok segítségével meghatározhatjuk.

6.1.2. Szélsőérték-meghatározó algoritmusok

A Born—Oppenheimer-közelítésmód tükrében a potenciálenergia-felszín „léte” abból adódik, hogy az atommagok és az elektronok egységes rendszerét „mesterségesen” szétválasztjuk. Ezért a potenciálenergia-felszínnek mindössze matematikai objektumoknak tekintendők, amelyek nem hordoznak fizikai realitást. Ha az úgynevezett „többtest-probléma” matematikai megoldását ismernénk, akkor az atommagok és elektronok rendszerének szétválasztására nem volna szükség (Born—Oppenheimer-közelítésmód) és a PEF fogalmának bevezetése is érdektelenné válna. Jelenleg azonban nem ez az eset, s addig, míg a megfelelő matematikai apparátus rendelkezésre nem áll, óhatatlanul a molekularendszerek egyensúlyi szerkezetét a megfelelő PEF tanulmányozásán keresztül érhetjük el. Bár a Born—Oppenheimer-módszer csupán a valóság közelítő leírását adhatja, mégis a tökéletlen leírásmód kedvező oldala, hogy a feladat megoldását a már korábról ismert szélsőérték-meghatározó algoritmusok alkalmazásával nyerhetjük. Tehát egy konformer geometriai adatainak kiszámítása visszavezethető egy PEF minimumhelyének meghatározására, amely feladat viszont már ismert és szélsőérték-meghatározó algoritmusok segítségével kivitelezhető. Amennyiben számítások és mérések eredményeit kívánjuk összehasonlítani, akkor fontos hangsúlyozni, hogy a minimumhelyekhez tartozó konformációktól (azaz konformerektől)

eltérő geometriai alakzatok nem stabil szerkezetek, és ezért elsősorban a relaxált struktúrák tanulmányozása a fő célkitűzés.

Az előző fejezetben vázlatosan ismertettük, hogy például a *többdimenziós konformációanalízis* segítségével a várható szélsőértékek száma, sőt közelítő elhelyezkedése is meghatározható. Az így meghatározott kritikus pont „közvetlen közelében” kiszámítjuk az első deriváltakat, majd egy kedvezően megválasztott eljárás segítségével úgy változtatjuk az atommagok relatív térbeli helyzetét, hogy az első deriváltak értékei a nullához konvergáljanak. Ez leggyakrabban egy többlépéses iteráció eredménye, melyet az eltérő módszerek különbözőképpen valósítanak meg. Mindenekelőtt meghatározzuk az első parciális deriváltak értékeit (lásd például a 6.2b egyenletet) a kiindulási pontban (\mathbf{x}^0), majd ennek ismeretében fölírjuk a következő egyenleteket, amely az i . belső koordinátára nézve a következő alakot ölti:

$$\mathbf{x}'_i = \mathbf{x}^0_i + \text{konst.} * \frac{\partial f(\mathbf{x}^0)}{\partial x_i} = \mathbf{x}^0_i + \text{konst.} * \nabla f(\mathbf{x}^0). \quad (6.4)$$

A konstans értékének célszerű megválasztása után kiszámíthatjuk az i . belső koordináta új értékét (\mathbf{x}'_i), amelyek segítségével felírhatjuk az új helyvektort (\mathbf{x}'). Ezen ponthoz tartozó függvényértéktől elvárjuk, hogy kisebb legyen, mint az előző lépés során hasonló módon kiszámolt függvényérték [$f(\mathbf{x}') < f(\mathbf{x}^0)$]. A legismertebb ilyen gradiens eljárások közé sorolható az erőteljes, de lassan konvergáló legmeredekebb lejtő módszer („steepest descent”) [227], valamint a különböző konjugált gradiens algoritmusok [228—231]. A tényleges számítások elvégzésekor a newtoni módszerek alkalmazása felbecsülhetetlen előnyökkel jár, ám itt a gradiens mellett a második deriváltak ismerete is szükséges. A két legismertebb ilyen algoritmus a kvázi-newtoni és a csonkított-newtoni módszer. A Newton, pontosabban Newton és Raphson nevével fémjelzett módszerek alap gondolata, hogy a potenciált a minimum környezetében kvadratikus alakkkal közelítjük, ahol az i ellépés irányát a Hess-mátrix ismeretében jelöljük ki. Ilyen és hasonló eljárások segítségével meghatározhatjuk a kritikus pontok helyét, amelyek rendűségét a Hess-mátrix (6.2c egyenlet) diagonális elemeinek előjelei alapján osztályozzuk. (Ismét emlékeztetünk arra, hogy a Hess-mátrixnak minimum esetén nincs negatív diagonális eleme, melyet célszerű ellenőrizni minden minimumnak vélt konformáció esetében.)

6.2. ENERGIAFÜGGVÉNYEK

A klasszikus mechanikában a rendszer energiája, illetve energetikai egyensúlya az erőter ismeretében írható le. Centrális erőter esetében két tömeg vonzása során, mint például a nap meg a föld, fellépő erő a két tömeg (m_1 és m_2), valamint azok távolsága esetén kiszámítható. Ha parányi golyókként fognánk fel a molekulában levő atomokat, akkor azok relatív pozíciója és energiája is leírható lenne a klasszikus mechanika segítségével, mindössze a megfelelő összetett erőteret (force field-et) kellene ismernünk. (Ez az erőter nem gravitációs, hanem az atomok közötti vonzások és taszítások hatásából tevődik össze.) Tehát a molekulákban érvényre jutó erőter sokkal bonyolultabb, mint például a naprendszer centrális erőtere, mivel a molekulában levő atomok egy olyan erőterben mozognak, amely egy némiképpen harmonikus mozgást tesz lehetővé, egy hipotetikus nyugalmi állapot körül. A Born—Oppenheimer-megközelítés azt is jelenti, hogy minden atommagkonfigurációhoz (\mathbf{x}) egy teljes energia rendelhető, amely együttesen maga a potenciális energia hiperfelszín (PEHF). Ezért az $E = E(\mathbf{x})$ függvény voltaképpen a molekuláris erőter (force field). Ilyen értelemben a klasszikus mechanikához hasonlóan, a molekuláris probléma is egy „force-field” probléma. Mindezeket összevetve nyilvánvaló, hogy a PEHF pontjai, amelyek a konformációs viszonyokat is leírják, kiszámíthatók a kvantummechanika alapján, vagy becsülhetők a klasszikus mechanikai alapokon nyugvó MM módszer segítségével. A pozitív atommagok és a negatív elektronok kölcsönhatását sem könnyű feladat egy ilyen „erőter” eljárásba beépíteni már csak azért sem, mert az elektrosztatikus kölcsönhatás a pozitív atommagok és a negatív elektronok között klasszikusan nem értelmezhető. Már Bohr korában nyilvánvalóvá vált, hogy egyszerű elektrosztatikus erőter esetében az elektronok a magba zuhannának (klasszikus elektrodinamika). Ilyen szükségszerűségek vezettek a kvantummechanika kifejlesztéséhez, amely voltaképpen azt deklarálta, hogy a molekulák „mikrovilága” a klasszikus eszközökkel nem értelmezhető.

A kvantummechanika értelmében (Heisenberg, Born, Schrödinger és mások) a molekula teljes energiáját a Schrödinger-egyenlet megoldásából kapjuk:

$$\hat{H}\psi = E\psi, \quad (6.5)$$

ahol \hat{H} a Hamilton-operátor, ψ a hullámfüggvény és E a teljes energia, mely az elemi részecskék (atommagok és elektronok) teljes térbeli szétválasztásához lenne szükséges. A kvantummechanika tükrében az atommagok és elektronok „elhelyezkedési pontjai” helyett tartozkodási valószínűségeket adunk meg, amelyet a hullámfüggvény (ψ) alapján határozunk meg. A klasszikus mechanikában alkalmazottakhoz hasonlóan a nem relativisztikus Hamilton-operátor egy kinetikus, valamint egy potenciális tagból tevődik össze, ahol a kinetikus energia operátor (\hat{T}) egy differenciál operátor.

$$\hat{T} = -\frac{1}{2} \sum_i \left(\frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2} \right) = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 \quad (6.6a)$$

A potenciális energia operátor (V) az i . és a j . részecskepár relatív távolságadatait tartalmazza.

$$\hat{V} = \sum_{i < j} \left(\frac{1}{r_{ij}} \right) \quad (6.6b)$$

A (6.6a) és (6.6b) egyenletek egyszerű formája annak köszönhető, hogy atomi (a. u.) és nem pl. cgs. egységben írtuk azokat fel. Éppen ezért az így felírt operátorok segítségével kiszámított energiákat úgynevezett Hartree atomi egységben (hartree) szokták megadni, mely független a mindenkori mérések pontosságától. (A jelenleg meghatározott m , e és h értékek mellett $1 \text{ hartree} = 627,51 \text{ kcal/mol}$.)

A Hamilton-operátor a molekula kémiai szerkezetének ismeretében egyértelműen megadható, ezért a molekulára jellemző és annak minden belső energetikai kölcsönhatását magában foglalja. A \hat{H} -től eltérően, a hullámfüggvény a molekuláris rendszer állapotától függ. Mivel a fotokémia területétől eltekintve a kémia csaknem kizárólag az alapállapot kémiája, a Schrödinger-egyenlet megoldását főleg az alapállapotra keressük. A hullámfüggvény egyidejűleg a molekulát felépítő *minden atom és minden elektron* eloszlási valószínűségével áll kapcsolatban. Egy ilyen „*többszemélyes problémát*” direkt módon nem tudunk megoldani. A Born—Oppenheimer-megközelítés tükrében a teljes teret atommag-konfigurációs és elektronkonfigurációs alterekre tagolhatjuk. Ez teszi lehetővé, hogy az elektronok leírását egy rögzített atommag-konfiguráció esetében kíséreljük meg, amely állapothoz rendeljük a hullámfüggvényt.

A kvantummechanika alkalmazása során a hullámfüggvény felépítése komoly problémát jelent. Mivel az elektronok Fermion jellegű részecskék, hiteles leírásukhoz antiszimmetrikus hullámfüggvényt (ψ) kell alkalmaznunk. A legáltalánosabb módszer a sokelektronos hullámfüggvény felépítésére a sokelektronos determinánsokba (elektronikus konfigurációkba) való sorbafejtés módszere, amely az irodalomban a konfigurációs interakció (CI [configuration interaction]) néven ismert.

$$\psi(1, 2, \dots) = \sum_{i=0}^n c_i \phi_i(1, 2, \dots) \quad (6.7a)$$

Ahány sorbafejtési tagot veszünk figyelembe, annyi elektronikus konfigurációt alkalmazunk a molekula kvantummechanikai leírása során. Ha a sorbafejtés nulladik tagjánál megállunk, akkor a sok-elektronos hullámfüggvényt egyetlen determinánssal közelítjük csupán. Ebben az esetben minden molekulapálya (χ_i) kétszer fordul elő, egyszer α és egyszer β spinnel a dupla betöltöttségnek megfelelően (double occupancy).

$$\begin{aligned} \psi(1, 2, \dots) &\cong \phi_0(1, 2, \dots) = \\ &= (n!)^{-1} \begin{vmatrix} \chi_1(1)\alpha(1), \chi_1(1)\beta(1) \cdot \chi_{n/2}(1)\beta(1) \\ \chi_1(2)\alpha(2), \chi_1(2)\beta(2) \cdot \chi_{n/2}(2)\beta(2) \\ \chi_1(1)\alpha(1), \chi_1(1)\beta(1) \cdot \chi_{n/2}(n)\beta(n) \end{vmatrix} \end{aligned} \quad (6.7b)$$

A molekulapályák ($\chi_1, \chi_2, \dots, \chi_{n/2}$) azonban ismeretlenek, ezért ezeket HARTREE és FOCK nyomán egy, a Schrödinger-egyenlethez hasonló, de pseudo-egyelektronos hullámegyenlet segítségével határozzuk meg. Ezt az egyenletet gyakran HF-egyenletnek is hívják, amely

$$\mathcal{F}(1)\chi_i(1) = \mathcal{E}_i(1)\chi_i(1) \quad (6.7c)$$

alakú, ahol χ_i az i . molekulapálya (MO), \mathcal{E}_i az i . MO-hoz tartozó energia. A $\mathcal{F}(1)$ (Fock-operátor) összegzi mindazt az energetikai kölcsönhatást, amelyet egy elektron érez az összes elektron és az összes atommag együttes terében. A χ_i molekulapályákat a legcélszerűbben Gauss ($\exp[-x^2]$)-jellegű atomi bázisfüggvények (η_k) lineárkombinációiként állíthatjuk elő:

$$\chi_i = \sum_{k=1}^N c_{ki} \eta_k, \quad (6.8)$$

mikor a Hartree—Fock-egyenlet [6.7c] megoldásait keressük.

Leggyakrabban a (6.7c) egyenlet alapállapotra vonatkozó megoldását *variációs* vagy *perturbációs* módszerek eredményezik. Az első kategóriába tartozó legismertebb Hartree—Fock SCF-eljárás mellett a perturbációs módszereket Moller—Plesset-eljárásnak is szokták hívni, mely a többtest perturbációs eljárással van összefüggésben. Az utóbbi módszer, bár pontosabb energiaértéket adhat, jóval számításigényesebb, mint egy SCF szintű energiameghatározás.

Az energiaszámolás során a pályák átfedéséből adódóan négy-, három-, két- vagy egycentrum-integrálok sokaságát kell meghatározunk. Nagy vonalakban igaz, hogy ha minél több bázisfüggvényt alkalmazunk az elektronok leírása során, valamint ha minél kevesebb elhanyagolást eszközölünk az integrálok kiszámítása esetén, akkor egyre pontosabb geometriai paraméterek és teljes energiaértékek határozhatók meg. Mivel nagyságrendben a bázisfüggvények számának negyedik hatványával nő a kiszámításhoz szükséges komputeridő, polipeptidek számítása esetén óhatatlanul kompromisszumok sorozatába kell bocsátkoznunk, amely tény elkerülhetetlenül csökkenti a számolt szerkezetek megbízhatóságát. Nem áll módunkban részletesen kitérni a különböző módszerek elhanyagolásaira, ám fontos megjegyeznünk, hogy adott kérdésfelvetés esetén figyelniük kell arra, hogy helytálló módszer segítségével határozzuk meg a molekula teljes energiáját. Amíg például a CNDO (Compleat Neglect of Differential Overlap) módszerek esetében minden két különböző atompálya differenciális átfedését elhanyagoljuk, amely egy igen széles körű elhanyagolást jelent az összes integrál kiszámításának tükrében, az INDO (Intermediate Neglect of Differential Overlap), valamint a MINDO (Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap) módszerek, igaz hosszabb idő alatt, de nagyobb pontosságot eredményezhetnek. További egyszerűsítést jelent az EHT (Extended Hückel-Theory) módszer, amelyet HOFFMAN a klasszikus HT (Hückel-Theory) megoldásból fejlesztett tovább. Az egyszerűsített variációs alapú SCF eljárások mellett (CNDO/1, CNDO/2, INDO, MINDO, MNDO stb.) a peptidkémia területén egyszerűsített perturbációs módszerek alkalmazására is találhatunk példákat. PULMAN és

munkatársai már a 70-es években sikeresen alkalmazták a PCILO (Perturbative Configurational Interaction using Localized Orbitals) eljárást, amelyet éppen a peptidek és polipeptidek konformációanalízise céljából fejlesztettek ki.

A polipeptidlánc hosszának növelése odavezethet, hogy előbb vagy utóbb még a legdurvább kvantumkémiail módszerek sem alkalmazhatók és csupán a klasszikus mechanika alapján felírt teljes energia kiszámítására nyílik lehetőség. Ilyenkor a potenciális energia nagyszámú igen változatos empirikus energiatag összege, például kötéshossz nyújtási, kötésszög kitérítési, forgási, csavarási, taszítási nemkötő kölcsönhatás, vonzási, valamint coulomb jellegű energiajárulékokból összegződik.

$$\begin{aligned}
 E_{\text{pot}} = & \Sigma D_b \{1 - \exp[-a(b - b_o)]\}^2 + \\
 & + 0,5 \Sigma H_\theta (\theta - \theta_o)^2 + \\
 & + 0,5 \Sigma H_\phi [1 + s \cos(n\phi)] + \\
 & + 0,5 \Sigma H\chi^2 + \\
 & + \Sigma \Sigma F_{bb'} (b - b_o)(b' - b'_o) + \\
 & + \Sigma \Sigma F_{\theta\theta'} (\theta - \theta_o)(\theta' - \theta'_o) + \\
 & + \Sigma \Sigma F_{b\theta'} (b - b_o)(\theta - \theta_o) + \\
 & + \Sigma F_{\theta\theta' \phi} \cos \phi (\theta - \theta_o)(\theta' - \theta'_o) + \\
 & + \Sigma \Sigma F_{\chi\chi'} \chi\chi' + \\
 & + \Sigma \Sigma [A_{ij} r_{ij}^{-12} - B_{ij} r_{ij}^{-6} + q_i q_j r_{ij}^{-1}] \quad (6.9a)
 \end{aligned}$$

Az ilyen FF (Force Field) eljárások eredményes alkalmazásának előfeltétele, hogy a vizsgált molekulatípusról hiteles képet adó paraméterrendszert előzetesen meghatározzuk. Jelenleg számos FF módszer létezik, amelyeket különböző célok érdekében eltérő módon parametrizáltak [15, 16, 231—234, valamint mások].

Az elmúlt évtizedek vitathatatlan eredményei mellett a „túlertelmezett” szerkezetek, valamint az alulbecsült konformációs mozgékonyásra utaló meglátások fémjelzik a peptidkémiai szakirodalmat. Ez azonban nem ingathatja meg a bizalmat a számított térszerkezetek iránt, inkább serkentőleg kell hatnia a térkémia fejlődésére. Az adott probléma megoldásához esetenként csak a torziósszögek mentén, más esetekben az összes belső koordináta figye-

lembevételével relaxált molekulaszervezet meghatározására van szükség. Történhet az energiameghatározás a legegyszerűbb szemléletmód alapján vagy akár az összetettebb elektronkorrelációs hatást is figyelembe vevő eljárás segítségével, a relatív vagy abszolút energiasorrend megállapítása során mindig óvatosan kell eljárunk. Az elkövetkező néhány oldalon utalunk a számítások segítségével meghatározott szerkezetek egyes példáira, különös figyelmet szentelve az *ab initio* módszerek eredményeire. Kivonatos áttekintésünk során hagyománytiszteletből az elsőként teret hódító MM és MD módszerekről szólunk, amelyek jelentősége ma első sorban a polipeptidek és fehérjék szerkezetkutatásában van.

6.3. DI- ÉS TRIPEPTIDEK KONFORMÁCIÓANALÍZISE

Igen nehéz bármilyen szempont szerint összegyűjteni a peptidkonformációs irodalom számításokkal kapcsolatos eredményeit. Mivel jelen tanulmányunk elsősorban problémafelvető szándékú, nem törekedtünk sem arra, hogy módszertani, sem hogy szerkezeti szempontok szerint lefedjük a téma teljes területét. Célkitűzésünk továbbra is az maradhat csupán, hogy a konformációs alaproblémák vázolója mellett egy-két példát is bemutassunk, a sokszínű paletta számos érdekességéből. Megítélésünk szerint a távoli kölcsönhatások nem tárgyalhatók „általában”, már csak azért sem, mert minden peptid vagy fehérje egyedi konformációjú. Ugyanakkor a közeli kölcsönhatások a vizsgált aminosavtól a szekvencia mentén eltávolodva viszonylag hamar lecsengenek. (Nevezhetjük akár peptidkémiai szomszédcsoport hatásnak is ezt a jelenséget, ahol a szomszédcsoport maga a szomszédos aminosav.) Teljességre törekedve, legjobb esetben is csupán tipikus peiodikus vagy aperioidikus alegységek (1.4. ábra) önkényesen definiált csoportjait általánosíthatjuk. Történeti szemszögből nézve, az állandóan bővülő másodlagos szerkezeti elemeket (α -hélixek, β -rétegek és β -kanyarok) tömörítő osztályok meghatározása úgy történt, hogy azok legalább ideig-óráig alkalmasan betölthessék feladatukat. A kategorizálás dinamikus fejlődése talán legjobban a „ β -kanyarok” példáján mutatható be, ahol a szerkezetek besorolása az idővel folyamatosan módosult. VENKATACHALAM (1968) elméleti alapokon nyugvó β -kanyar definícióját követően hamarosan megkezdődött a fehérjék krisztallográfiai adatainak feltérképezése is és a talált

β -kanyarok konformációs besorolása. A különböző hajtúkanyar-elrendeződések eltérő gyakorisága miatt, a kutatás korai stádiumában elegendő volt csupán az I és a II típusok megkülönböztetése. A III típusú β -turn gerinckonformáció torziósszögértékei nagy hasonlóságot mutatnak az I típusú β -turn megfelelő adataival, ezért ezt a két kategóriát gyakran csak elméleti szinten különíthetjük el. A krisztallográfiai adatok analízisének gyakorlatában a torziósszögértékek szórásadatai a két típus megkülönböztetését nem teszik lehetővé. A kép teljessége érdekében, a 70-es évek derekán a IV és V β -turn osztályokat is bevezették, noha ezen konformerek torziósszögértékei nem, vagy csak részben voltak definiálva. Didaktikai szempontból tehát a később elkülönített VIa és VIb típusok ilyen módon a IV és V „gyűjtő osztályból” származnak. Az új kanyarok azonosítását az tette lehetővé, hogy a fehérjék röntgenkrisztallográfiai úton meghatározott koordinátáit tömörítő adatbázisok folyamatosan bővülnek, és lehetővé vált a megnövekedett szerkezeti adatok birtokában a két új típus (VIa és VIb β -turn típusok) elkülönítése. A 80-as évek második felében újabb kanyar konformáció azonosítása látott napvilágot, amelyet jobb híján VIII típusal jelöltek, noha az azt megelőző hét kategória közül három (a IV, V és a VII) nem valódi definíció, hanem csupán a „maradékulv” terméke (lásd 3. séma).

β -kanyar típus	Gerinckonformációs torziósszögértékek						
	φ_1	ψ_1	φ_2	ψ_2	konformációtípus		
I	-60	-30	-90	0	$\alpha_L\alpha_L$	$\alpha_L\gamma_L$	$\alpha_L\delta_L$
I'	60	30	90	0	$\alpha_D\alpha_D$	$\alpha_D\gamma_D$	$\alpha_D\delta_D$
II	-60	120	80	0	$\varepsilon_L\alpha_D$	$\varepsilon_L\gamma_D$	$\varepsilon_L\delta_D$
II'	60	-120	-80	0	$\varepsilon_D\alpha_L$	$\varepsilon_D\gamma_L$	$\varepsilon_D\delta_L$
III	-60	-30	-60	-30	$\alpha_L\alpha_L$		
III'	60	30	60	30	$\alpha_D\alpha_D$		
IV							
V							
VIa	-60	120	-90	0	$\varepsilon_L\alpha_L$	$\varepsilon_L\gamma_L$	$\varepsilon_L\delta_L$
VIb	-120	120	-60	0	$\beta_L\alpha_L$	$\beta_L\gamma_L$	$\beta_L\delta_L$
VII							
VIII	-60	-30	-120	120	$\alpha_L\beta_L$		

3. séma

A tényleges zavart elsősorban nem a következtelen nevezéktan jelenti, hanem az a bizonytalanság, hogy a β -kanyarok tipikus elemeinek meghatározása a fehérjekrisztallográfia függvényévé vált. Ilyen értelemben nem lehetne tudni, van-e még újabb kanyartípus és ha igen, akkor hány darab? Ugyanakkor a már meglevők között is konformációs átfedések tapasztalhatók (például az I és III típusú β -kanyarok). Éppen ez az utóbbi megfigyelés eredményezheti a megoldás kulcsát, nevezetesen azt, hogy az α_L , α_D , β_L , γ_L , γ_D , δ_L , δ_D , ε_L , és ε_D konformációtípusok segítségével bármely ez idáig ismert β -turn térszerkezete megadható. Ilyen jellegű kategorizálás előfeltétele azonban, hogy a diamid és a triamid rendszerek konformációs tulajdonságait mind mélyebben megismerjük.

Így tehát nemcsak arról van szó, hogy azért foglalkozunk a diés triamid-rendszerek szerkezeteinek behatóbb megismerésével, mert ma még csupán ekkora *ab initio* szintű számolások kivitelezésére van lehetőség, hanem arról is, hogy ezen konformációs alegységek megismerése döntő fontosságú lehet a lokális kölcsönhatások megértésében. Ezen ismeretek viszont sokat tisztíthatnának a fehérjék feltekeredésének ma még homályos képén.

6.3.1. Peptidkonformációk molekuláris mechanika, valamint félempirikus módszerek alapján

Gyakran az *ab initio* számításokon alapuló pontosabb, de nagyobb számításigényű konformációs potenciális energia felszín kiszámítása helyett megelégszünk a felszint többé-kevésbé jól leíró analitikus függvények meghatározásával. A legegyszerűbb ilyen „force-field” megfontolás mindössze arra szorítkozik, hogy csupán egyetlen taszító potenciált vegyen figyelembe, amely értéke konstans, ha a két kovalensen nem kötött atom távolsága nagyobb, mint a két atom van der Waals-sugarának összege ($r > r_A + r_B$), illetve $r \leq r_A + r_B$ esetben végtelen.

$$E_{\text{pot}} = \begin{cases} E(r) = \text{const.} & \text{ha } r \leq r_A + r_B \\ E(r) = \infty & \text{ha } r > r_A + r_B \end{cases} \quad (6.9b)$$

Már ezen legegyszerűbb megfontolás értelmében is, amely mindössze azon alapszik, hogy az atomok típusuk függvényében eltérő

térigényűek, a Ramachandran-felszín teljes ϕ , ψ tartományának jelentős része konformációs szempontból tiltott területté válik [235, 236].

A merevhéjú gömbmodellhez képest [(6.9b) egyenlet] hitelesebb leírást ad a Lennard és Jones nevével fémjelzett 6—12-es potenciál alkalmazása.

$$E_{\text{pot}} = E(r) = f(-r^{-6} + r^{-12}) \quad (6.9c)$$

A peptidek konformációs viszonyait még hívebben tükrözi az ECEPP (Empirical Conformational Energy Program for Peptides [237]) potenciálisenergia-becslő erőterfüggvénye.

$$\begin{aligned} E_{\text{pot}} = & \sum_{i < > j} \varepsilon_{ij} [(r_{ij}^o / r_{ij})^{12} - 2(r_{ij}^o / r_{ij})^6] + \\ & + \sum_{i < > j} \varepsilon_{ij} [5(r_{ij}^o / r_{ij})^{12} - 6(r_{ij}^o / r_{ij})^{10}] + \quad (6.9d) \\ & + \sum_{i < > j} q_i q_j / (D r_{ij}) + \sum_k A_{kj} / 2(1 \pm \cos n\theta_k) \end{aligned}$$

Ez a potenciálisenergia-kiszámítási eljárás már figyelembe veszi a Lennard—Jones-tag mellett a 10—12-es hidrogénhidakra parametrizált tagot, valamint a Coulomb-taszítás és a kovalens kötések elforgatását kísérő energiajárulékokat is. A (6.9a—d) egyenletekben leírtakhoz hasonló, úgynevezett parametrizált közelítő empirikus függvények bevezetése, mely additív tagok összegeként áll elő, viszonylag gyors potenciális energiameghatározást tesz lehetővé. Az irodalomban még ma is találhatunk például aminosavak ikerionos formáira vonatkozó Monte Carlo módszeren alapuló konformációanalízist, noha a számítástechnika dinamikus fejlődésének köszönhetően az izolált aminosavak vákumra vonatkozó geometriai tulajdonságait ma elsősorban a pontosabb *ab initio* számításokra alapozhatjuk [238, 239]. Bár speciális esetekben már hexapeptidek *ab initio* kiszámítása is lehetségessé vált, jelenleg a dipeptid (For- X_{xx} - NH_2 , Ac- X_{xx} - $NHMe$ stb.) mérettartomány tekinthető módszertani küszöbértéknek (lásd később), így a hosszabb peptidek, illetve kisebb molekulák asszociált vagy szolvatált szerkezetének nagy pontosságú számításaira még ma sincs lehetőség.

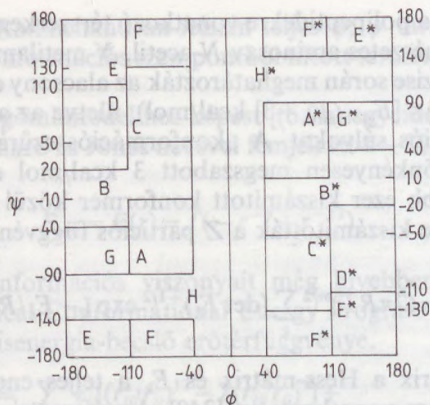
Az elmúlt 20 évben SCHERAGA és munkatársai, valamint más kutatók széles körű MM és MD típusú számítások elvégzésével

gazdagították a polipeptidekre vonatkozó térszerkezeti ismereteinket. A 20 természetes aminosav *N*-acetyl, *N*-metilamidjainak konformációanalízise során meghatározták az alacsony energiájú konformereket ($E_i \leq [E_{\text{glob.min.}} + 3]$ kcal/mol), illetve az azokhoz tartozó konformációs súlyokat. A „konformációs szűrést” követően, amelyet egy önkényesen megszabott 3 kcal/mol energiaküszöb jelentett, a több ezer kiszámított konformer közül a megmaradt 591 szerkezetre kiszámították a *Z* partíciós függvény értékeit.

$$Z = (2\pi RT)^{m/2} \sum_k (\det F_k)^{-1/2} \exp(-E_k/RT) \quad (6.10)$$

Itt az F_k mátrix a Hess-mátrix és E_k a teljes energia értéke a k -minimumra vonatkoztatva [240]. A parametrizált MM módszert tovább fejlesztették, és az ECEPP segítségével, néhány évvel később ugyanezeket a számításokat megismételve [241] hasonló konformációs betöltöttségi arányok megállapítására jutottak. Az alacsony energiájú konformerek kiválasztásánál alkalmazott küszöbértéket megemelték ($E_i \leq [E_{\text{glob.min.}} + 5]$ kcal/mol), és így aminosavanként az R-csoport konformációs jellegétől függően, mindig 100-nál kevesebb minimumot azonosították csupán. A különböző aminosavak esetében számított gerinckonformációt leíró torziószögek értékeit a $\{\phi, \psi\}$ felszínen ábrázolták. A „bal” félsíkot $\{-180^\circ \leq \phi \leq 0^\circ - 180^\circ \leq \psi \leq +180^\circ\}$ hét konformációs tartományra (**A, B, C, D, E, F, G, H**) osztották fel. Ezzel analóg a teljes Ramachandran-felszín megmaradt térrészét („jobb” félsík), a centrálszimmetria (C_2) következtében, hét, csillaggal jelölt (**A*, B*, C*, D*, E*, F*, G*, H***) alterületre tagolták (6.12. ábra).

Meg kell azonban jegyeznünk, hogy sem az alkalmazott elméleti módszerekből, sem a peptidok térszerkezetéből nem következik a $2 \cdot 8 = 16$ páronként C_2 -es szimmetriájú kvadránsok meghatározása. Továbbá nem teljesen világos az sem, hogy a konformációs periodicitással $\{\phi = \phi \pm 360^\circ, \psi = \psi \pm 360^\circ\}$ milyen módon van összhangban az alterületek határvonalainak kijelölése. Mindez azonban csak másodlagos jelentőségű, mert az az alap gondolat igen figyelemreméltó meglátás, amely szerint a gerinckonformációt leíró $\{\phi, \psi\}$ torziószögek mentén klaszterosodás figyelhető meg már a legegyszerűbb Ac-Xxx-NH₂ modellek esetén is. Éppen ez a megállapítás nyújt lehetőséget arra, hogy a bonyolult oligopeptidek konformációs viselkedéseit, kispeptidekre alapozott



6.12. ábra. Védett aminosavak konformációs eloszlása alapján (ECEPP számítá-
sok [241]) a teljes $\{\phi, \psi\}$ felszín két félsíkra osztható. A jobb térrész
 $\{-180^\circ \leq \phi \leq 0^\circ - 180^\circ \leq \psi \leq +180^\circ\}$ továbbí hét alrészre parcellázható (A, B, C, D,
E, F, G, H). A megmaradt konformációs területet a centrális szimmetria (C_2)
megőrzése mellett a $A^*, B^*, C^*, D^*, E^*, F^*, G^*, H$ tartományokra oszthatjuk fel

„additív konformációs modellek” segítségével közelítsük [lásd (1.7)
és (1.8) egyenletek].

A kisméretű peptidek konformációanalízise során elsőként alkalmazott MM számolások egy új korszak kezdetét jelentették, hiszen a „spekulatív modellezés” mellett az energiaértékek esetenkénti meghatározásával relatív stabilitások becslésére nyílt elvi lehetőség. Az elmúlt néhány év tapasztalata azonban rámutatott arra, hogy MM számolások esetén pont az energiaértékek közvetlen felhasználása során kell a legelővigyázatosabban eljárni. Különböző konformerek esetén a parametrizált eljárások segítségével kiszámított relatív energiasorrendek sem feltétlenül megbízhatók, míg a tényleges energiakülönbségek (ΔE) gyakran messze esnek a kísérletileg meghatározott stabilitáskülönbség értékeiktől. Ezért nem mindig célszerű a SCHERAGA és mások által javasolt alacsony energiájú konformerek kiválasztása a globális minimumhoz viszonyított energia küszöbérték alapján (pl. $E_i \leq [E_{\text{glob. min.}} + 5]$). Még ha a globális minimum meghatározása helyesen is történik, a relatív stabilitás alapját képező energiakülönbségek, illetve az azokra alapozott elméleti előfordulási valószínűségek ($p_i^{\text{theo.}}$) erős módserfüggést mutatnak.

6.1. táblázat

A For-L-Ala-NH₂ konformerjeinek relatív stabilitása, valamint azok ΔE alapú előfordulási valószínűsége ($p(i)$) a (6.11) egyenlet értelmében

BB*	ΔE (kcal/mol)			$p(i)$		
	ECEPP/2	HF/ 3-21G	HF/ 6-31+G*	ECEPP/2	HF/ 3-21G	HF/ 6-31+G*
γ L	0,00	0,00	0,00	0,65	0,88	0,57
β L	1,00	1,25	0,19	0,12	0,11	0,41
α L	1,14	—	—	0,09	—	—
δ L	1,29	3,80	2,24	0,07	0,00	0,01
ε L	1,51	—	—	0,05	—	—
δ D	2,29	7,30	5,52	0,01	0,00	0,00
α D	2,73	5,93	4,73	0,01	0,00	0,00
ε D	5,64	8,16	—	0,00	0,00	—
γ D	8,28	2,52	2,56	0,08	0,01	0,01

$$R^*T = 0,00198 \cdot 298 = 0,59 \text{ kcal/mol}$$

$$p_i^{\text{theo.}} = \frac{e^{-\Delta E_i/RT}}{\sum e^{-\Delta E_i/RT}} \quad (6.11)$$

(6.1. táblázat.) Ennél lényegesen homogénebb képet kapunk, ha megelégszünk csupán a konformációs paraméterek (pl. ϕ , ψ) összehasonlításával (6.2. táblázat). Bár az alkalmazott módszer függvényében esetenként 10 vagy akár 20 fokos konformációs módosulás is megfigyelhetünk, a tapasztalat szerint azok a konformerek, amelyek az eltérő eljárások egyformán megtalálnak, általában kvalitatív vagy félkvantitatív konformációs azonosságot is mutatnak. (Az *ab initio* módszerek esetében megfigyelt α_L , valamint ε_L minimumok annihilációját részleteiben a következő fejezet tárgyalja.)

Az empirikus eljárások kis számolási igényének köszönhetően a hetvenes évek végére már a védett dipeptidok vagy más szóval triamid rendszerek (pl. Ac-Xxx-Yyy-NHMe) konformációanalízise is elvégezhetővé vált. Az Ac-Gly-Yyy-NHMe, Ac-Xxx-Gly-NHMe, valamint az Ac-Ala-Yyy-NHMe, Ac-Xxx-Ala-NHMe legegyszerűbb triamid rendszerek mellett, az Ac-Ser-Yyy-NHMe, Ac-Xxx-Ser-NHMe és az Ac-Pro-Yyy-NHMe, Ac-Xxx-Pro-NHMe [242—245] dipeptidok legfontosabbnak vélt szerkezeteit is meghatározták. A közelítő eljárások utólagos értékelése során a

6.2. táblázat

A For-L-Ala-NH₂ gerinckonformerjeinek torziószögértékei az alkalmazott elméleti módszer függvényében

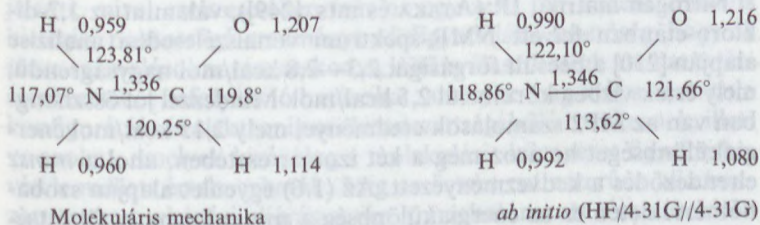
BB*	ECEPP/2		HF/3-21G		MPZ/6-311++G(d, p)	
	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ
γ L	-80,5	76,3	-84,4	67,7	-82,8	+80,6
β L	-154,8	157,7	-168,4	170,9	-157,1	+163,2
α L	-73,3	-35,6	—	—	—	—
δ L	-150,5	47,8	-127,8	30,0	—	—
ε L	-77,1	146,4	—	—	—	—
δ D	-159,5	-57,9	-178,6	-44,0	-166,0	-39,9
α D	54,8	46,3	63,8	32,7	+63,1	-35,5
ε D	64,4	-178,0	67,6	-178,1	—	—
γ D	79,9	-63,3	73,9	-56,7	+74,4	-49,1

legkomolyabb kételyt a felállított relatív stabilitási sorrendek megbízhatósága mellett azt jelenti, hogy az MM számolások nagyszámú *ab initio* számolások szerint nem létező konformert is létezőnek tekintett. Bár ZIMMERMAN és SCHERAGA [243] csupán 35 úgynevezett alacsony energiájú minimumot határoztak meg ($E_i \leq [E_{\text{glob.min.}} + 3]$ kcal/mol) például az Ac-L-Ala-L-Ala-NHMe molekula esetében, valójában az ECEPP/2 eljárás 75 különböző gerinckonformert eredményez, ha nem alkalmazzuk az energiaérték szerinti kizárás elvét. Az utóbbi számtól erősen eltér az *ab initio* számolások által hitelesített mindössze 49 különböző gerinckonformer [246]. A konformerek számának túlbecslése elsősorban a nem elég körültekintő parametrizálás következménye, amely elsősorban a fehérjék és nem a peptidek konformációs tulajdonságainak hiteles leírását célozta.

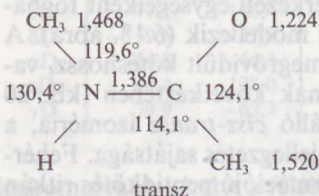
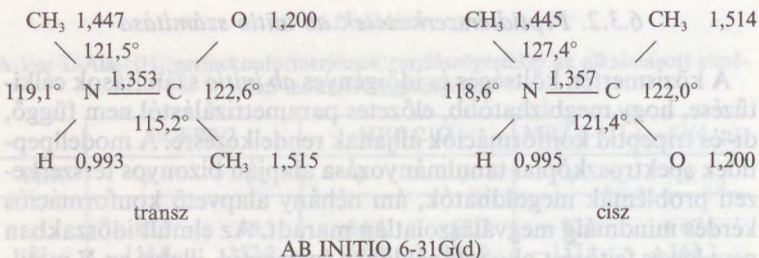
Összegzésként megállapíthatjuk, hogy ha a PEHF egyes pontjait a klasszikus mechanika segítségével becsüljük (force field módszerek) ahelyett, hogy kiszámítanánk kvantummechanikai alapokon nyugvó számítások segítségével, akkor a kapott konformerek relatív stabilitása bizonytalan. Nem megdöbentő továbbá az sem, hogy az MM eljárással becsült felszín topológiája is eltérhet a valódi PEHF topológiájától, és így kritikus pontok, tehát konformerek eltűnésével vagy megszületésével is számolnunk kell. Ugyanakkor azok a geometriai adatok jól hasznosíthatók, amelyek a becsült PEHF-nek abból a részéből származnak, ahol az jól közelíti a tényleges PEHF-t.

6.3.2. Peptidészervezetek *ab initio* számítása

A közismerten költséges és időigényes *ab initio* számítások célkitűzése, hogy megbízhatóbb, előzetes parametrizálástól nem függő, di- és tripeptid konformációk álljanak rendelkezésre. A modellpeptidek spektroszkópiái tanulmányozása alapján bizonyos térszerkezeti problémák megoldhatók, ám néhány alapvető konformációs kérdés mindmáig megválaszolatlan maradt. Az elmúlt időszakban nem kevés fejtörést okozott például a formamid, illetve az *N*-metilacetamid konformerjeinek pontos meghatározása. Ezek a vegyületek a fehérjék és peptidek alapvető szerkezeti egységeiként foghatók fel, amelyek magát az amidkötést modellezik (6.13. ábra). A normális C—N egyesítéshez képest megrövidült kötэшossz, valamint az amidkötés gátolt rotációjának következtében (kb. 20 kcal/mol magasságú forgásigát) fennálló *cisz-transz* izoméria, a természetes poliamid rendszereknek is jellegzetes sajátysága. Fehérjékben a két izomer közül a *cisz* konformációjú peptidkötés ritkán fordul elő, mivel az egyensúly majdnem teljesen a *transz* forma irányába van eltolva. A *cisz* és *transz* amidkötés kvázi egyensúlya a terciér amidok geometriai jellegzetessége és ezért elsősorban a természetes aminosavak közül a prolin szerkezeti sajátysága. Ezért a szekunder amidok *cisz* izomerjének geometriai adatait, valamint a *cisz-transz* egyensúly jellegzetes vonásait kísérleti úton nehezen vagy egyáltalán nem tanulmányozhatjuk. Ugyanakkor elméleti módszerek segítségével jól vizsgálható a probléma, mely elegendően pontos számítások esetén hiteles képet adhat a valóságról. (Közismert, hogy számos félempirikus eljárás alapvető hiányossága, hogy az amidkötés planáris jellegét nem adja vissza [247] és ezért a



6.13. ábra. A formamid kötэшossz (Å) és kötэшszög adatai két eltérő elméleti módszer alapján. A számítás függvényében a kötэшhosszadatok 0,01–0,03 Å, míg a kötэшszögek 1°–7° ingadozást mutatnak



ELEKTRONDIFFRAKCIÓ

6.14. ábra. Az *N*-metil-acetamid számított (ab initio 631—G[d]) kötőhossz és kötésszög adatainak módosulása a *cisz*, illetve a *transz* (antiperiplanáris) elrendezés esetén, valamint az elektrondiffrakcióval meghatározott szerkezet [277] geometriai paraméterei

cisz-transz egyensúlyi kérdés sem értelmezhető ilyen módszerek segítségével.) JORGENSEN és GAO [248] rávilágítottak arra, hogy az antiperiplanáris elrendeződés (*transz* forma) az energetikailag kedvezőbb, mind az izolált (gázfázisú rendszer), mind az egyszer „specifikusan” hidratált molekula esetében (6.14. ábra).

Nitrogén mátrixú IR (ATAKA és mts. [249]), valamint az 1,2-dikloro-etánban felvett NMR-spektrum vonalszélesedési analízise alapján [250] a becsült forgásigát 2,3—2,8 kcal/mol nagyságrendű, mely érték vízben körülbelül 2,5 kcal/mol. Mindezzel jól összhangban van az MP2 számítások eredménye, mely 2,15 kcal/mol energiakülönbséget határoz meg a két izomer esetében, ahol a *transz* elrendeződés a kedvezményezett. Az (1.6) egyenlet alapján szobahőmérsékleten ez az energiakülönbség a *transz* forma betöltöttségét körülbelül 95%-nak becsüli. Noha a molekuláris mechanikai számítások eredményei (ECEPP/2), az *ab initio* eredményekkel összhangban a *transz* geometriai elrendeződést valószínűsítik [251],

a valódi energiakülönbséget messze túlbecsülik ($\Delta E_{\text{transz/cisz}} = 5,8$ kcal/mol). Ez a „tévedés” jellegzetes és jól szemlélteti az *ab initio* és az MM típusú energiaszámolások minőségi különbségét. A „többszörösen” hidratált amidmodellek értelmezése ma még elsősorban a MD szimulációk segítségével oldható meg [248, 252 és mások] főleg azért, mert nagyszámú, tipikusan 216 vízmolekula együttese, *ab initio* módszerekkel nem számítható.

A fehérjék és peptidek hidrolízise vagy enzimatiskus hasítása az amidkötések felhasadását eredményezi, melyet követően a biopolimer felépítő aminosavak elegyét kapjuk. Ezért nem éréktelen a különböző aminosavak elméleti módszerekkel történő tanulmányozása még akkor sem, ha ezek a molekulák elsősorban a fehérjék konstitúciós és nem konformációs alapkövei. Az aminosavak konformációs tulajdonságai mellett elsősorban a vegyületek töltésvi-szonyainak mind pontosabb meghatározása jelenti a legfontosabb célkitűzést, amely adatok kulcsfontosságúak lehetnek egy megbízhatóbb MM vagy MD módszer kifejlesztése során. MAPLE és mts. [253] a formiátanion, míg SELLERS és SCHAFAER (254), SCHAFAER (255), CSÁSZÁR [238] és mások a gázfázisú glicin geometriai adatait határozták meg egyre pontosabb számítások segítségével. Megjegyezzük, hogy míg a diamid modellek (pl. For-Gly-N₂H) esetében már a HF/3-21G szintű számolások is helytálló geometriai paramé-tereket eredményeznek, addig az aminosavak esetében magasabb szintű számítások elvégzése látszik indokoltnak [238]. További elméleti érdekességet jelent a semleges (vagy neutrális), valamint az aminosavak ikerionos formáinak energetikai összehasonlítása [256, 257 és mások] *ab initio* módszerek segítségével.

Az *ab initio* számítások között ma a legfontosabb irányvonalat a különböző peptidek (pl. For-Xxx-NH₂) konformációanalízise jelenti, mivel ezek esetében már az egyszerű HF közelítésmód is kielégítő pontosságú eredményt ad. Egyedülálló lehetőség, hogy *ab initio* számításokra támaszkodva különválaszthatjuk azokat a térszerkezeteket befolyásoló hatásokat, amelyek magából a molekula konfigurációs és elektronikus elrendezettségéből következnek, illetve azokat, amelyek kizárólag a molekuláris környezet figyelembevétele mellett értelmezhetőek. Míg az összes rutinszerűen alkalmazott spektroszkópiái eljárás során a meghatározott térszerkezetek „környezetfüggők”, addig a számítások során (vákuum konformáció) ígéretes lehetőség a térszerkezetet befolyásoló „belső és külső” hatások kettéválasztása.

A szóba jövő minimális energiájú téralkatok számát és jellegét a még ma is igen költséges *ab initio* számolások megkezdése előtt, általában MM, MD vagy más kvalitatív módszerek segítségével szokták meghatározni. Komoly tévedések forrása lehet azonban az, hogy a fent említett minimumbecslő közelítő eljárások (MM, MD) alapjait olyan paraméterek biztosítják, amelyek elsősorban hoszabb peptidok röntgenkrisztallográfiai adataiból származnak. Manapság az az általános vélemény alakult ki, hogy míg a parametrizált módszerek esetenként elfogadható minőségű belsőkoordinátákat eredményeznek, addig az azokhoz tartozó energiaértékek, sőt maga a minimum megléte sem tekinthető bizonyosnak. Amint arra később utalni fogunk, számos olyan minimum valószínűsíthető MM számolások alapján, amelyek *ab initio* szinten nem nyertek igazolást. Ilyen eset például a For-L-Ala-NH₂ molekulának az α_L avagy ε_L konformációja, amelyeket valódi minimumokként azonosítanak a parametrizált módszerek. Ugyanakkor az *ab initio* szintű számítások ezen konformerek meglétét ez idáig nem igazolták.

Korábban kivonatossan ismertettük az *ab initio* számításokat megelőző, illetve azok értelmezéséhez elengedhetetlen konformációs-topológiai alapokat. Mivel egy rendszer konformáció-betölttségi analíziséhez elvileg szükséges az összes lehetséges konformer ismerete (1.6.), fontos, hogy nemcsak az alacsony energiájú, hanem az összes minimumhelyet meghatározzuk. A lehetséges gerinckonformációkat a környező aminosav oldalláncok mind elektronikus, mind szterikus úton befolyásolhatják. Külön kell választani azokat a kölcsönhatásokat, amelyek következtében az $E = E(\phi, \psi)$ függvény topológiája módosul, azaz a kritikus pontok száma is megváltozik, valamint azokat, amely során a kritikus pontok száma változatlan marad, ám az azokhoz rendelt potenciális energia értékek sorrendje módosul. Az oldalláncok szterikus befolyásának tanulmányozása céljából a 19 természetes aminosavat négy csoportba oszthatjuk (4. séma). A prolint merev pirrolidingyűrűje következtében külön kell tárgyalni, mivel mind a ϕ_{Pro} , mind a χ_1 torziószögek csupán rögzített értékeket vehetnek fel.

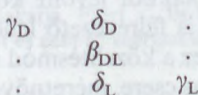
Ab initio számításokat az *N*-formil-glicinamid, *N*-formil-L-alaninamid, *N*-formil-D-alaninamid, *N*-formil-L-szerinamid és az *N*-formil-L-valinamid molekulákon végeztek [246, 258—266 és mások]. Ezek az *N*-formil-aminosavamidok a legegyszerűbb diamid-rendszerek, amelyek még elfogadhatóan modellezik a fehérje-

Típus	Oldallánc	Példa
1	— H	glicin
2	— CH ₃	alanin
3	— CH ₂ R	szerin
4	— CHRR'	valin

4. séma

lánc nem láncvégi aminosavjainak lehetséges gerinckonformációit. Bár a szakirodalomban már a 70-es évek óta megtalálhatók a peptidekre vonatkozó *ab initio* szintű energiaszámítások, valódi áttörést csupán az elmúlt 5 év jelentett, amely egybeesik a nagy sebességű személyi-munkaállomások megjelenésével.

A sztereoekémiai megfontolásokkal összhangban, az akirális *N*-formil-glicinamid PEF esetében 9 minimumhely feltételezhető, melyek közül azonban csupán öt létezik, s ezek közül is 2*2 degenerált; $E(\gamma_L) = E(\gamma_D)$, $E(\delta_L) = E(\delta_D)$. A három eltérő energiaszintből csupán a β_L párosítatlan konformáció, mely a PEF középrészen helyezkedik el. A lehetséges 9 minimumhely közül tehát csak 5 található meg SCF-HF energiaszámolások alapján, míg 2*2 minimumhely, nevezetesen az α_L/a_D , valamint az $\varepsilon_L/\varepsilon_D$ annihilációját figyelhetjük meg.



5. séma

A két minimumhely eltűnésével egyidejűleg, a topológia szabályai-val összhangban a magasabb rendű kritikus pontok (nyeregponatok és maximumok) számának szükségszerű módosulása is megfigyelhető. Az *N*-formil-glicinamid esetében számolt PEF C₂-es szimmetriája bármely királis rendszer esetén megszűnik. Ha a For-Gly-NH₂ molekulában az egyik H ^{α} -atomot formálisan helyettesítjük például egy metilcsoporttal, a megfelelő PEF-topológiája is jelentősen megváltozik (lásd 6. séma).

γ_D	δ_D	.	γ_D	δ_D	α_L
ε_D	β_L	.	.	β_L	ε_L
α_D	δ_L	γ_L	.	δ_L	γ_L

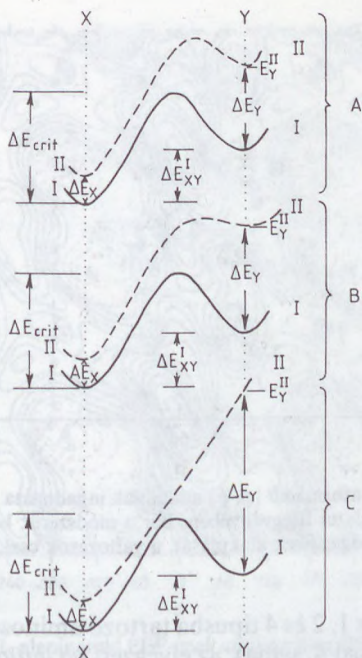
For-L-Ala-NH₂

For-D-Ala-NH₂

6. séma

A korábbi eredetű *ab initio* szerkezetanalízisek nem a konformációs alternívák összes minimumának feltárását célozták, hanem megelégedtek csupán az alacsony energiájú minimumok meghatározásával. Egy ilyen kísérlettervezést a költségmegtakarítás mellett az is indokolja, hogy a Boltzman-eloszlás értelmében [(1.6) egyenlet] a nagy energiájú minimumok csak kicsiny mértékben betöltöttek. Bár szigorú értelemben az (1.6) egyenlet nevezője nem számolható ki pontosan az összes konformer explicit ismerete nélkül, a gyakorlatban a nagy energiájú minimumok elhanyagolása nem okoz számottevő hibát a konformációs betöltöttségi szintek meghatározásában. Az energiák alapján történő szerkezetszelekció elve azonban más jellegű veszélyt is hordoz. A legfontosabb ellenvetés az, hogy a teljes energia meghatározása erős módszerfüggést mutat, amely azt eredményezheti, hogy a konformerek relatív energiasorrendje teljesen felborulhat módszerváltás esetén. Ez nemcsak azért kellemtelen, mert az eredmények „időállósága” rossz, mivel egy pontosabb számítás a korábbiakból levont következtetések sorozatát cáfolhatja, hanem azért is félrevezető lehet, mert magasenergiájú minimumok, amelyeket ez a közelítésmód semmisnek tekint, számítalan okból (szubsztituens csere, méretnövelés, hidrogénhidak stb.) alacsonyenergiájú minimumokká válhatnak. Így tehát nem csupán elvi jelentősége van a magasenergiájú minimumok meghatározásának (6.15. ábra), hanem gyakorlati következményei is jelentősek. Ettől eltérően a geometriai adatok (kötéshossz, kötésszög vagy torziós értékek) jóval kevésbé tekinthetők az alkalmazott elméleti módszer egyedi termékének, azaz ezen adatok „megbízhatósági” foka lényegesen nagyobb (6.16. és 6.17. ábra).

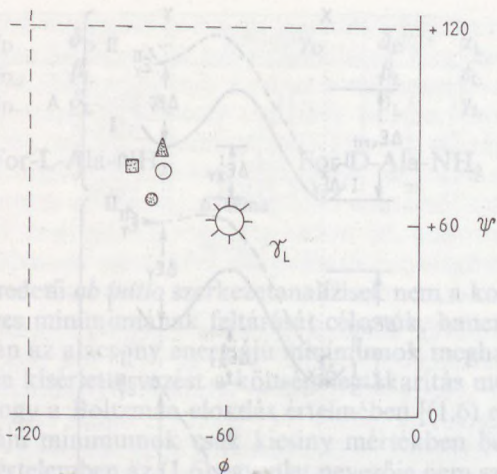
Az *N*-formil-L-alaninamid PEF-én szintén két minimumhely annihilációja fedezhető fel (α_L és ε_L konformerek), ám a For-Gly-NH₂ esetében tapasztalt energiadegeneráció megszűnése miatt itt 7 diszkrét energiaszint különíthető el. A szintvonalas PEF-en jól



6.15. ábra. Az X és az Y konformereket elválasztó potenciális energiagát értékének módosulása az Y konformer relatív energiájának megváltozása következtében. Vegyük észre, hogy míg az A és a B esetekben Y valódi szerkezet, mivel a potenciális energiefelületen minimumenergia rendelhető hozzá, addig a C esetben a minimum hiánya a szerkezet eltűnését takarja. Ezért a „lét és nemlét” jelenti a minőségi változást és nem az energiakülönbség

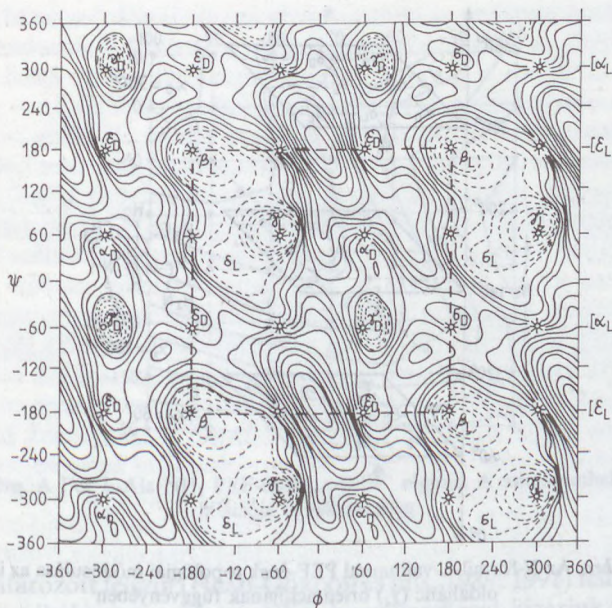
látható (6.17. ábra), hogy a két minimumhely annihilációja szükségszerűen együtt jár a magasabb rendű kritikus pontok számának megváltozásával is, amely összhangban van a Mezey-féle egyenlőtlenségekkel [266]. Az alanin modell topológiai viselkedéséhez sok szempontból hasonló az *N*-formil-L-valinamid gerinckonformációs viselkedéseit leíró PEF topológiai jellege. Bár a C^β szénatom magasabb szubsztitúciós állapota ($-\text{CHCH}_3\text{CH}_3$) az analízist bonyolítja, a χ^1 mindhárom kedvező térállása esetén, az α_L és ε_L konformerek eltűnését tapasztaljuk (6.18. ábra).

Összegezve megállapíthatjuk tehát, hogy a For-Gly-NH₂, For-Ala-NH₂, Ac-Ala-NH₂, valamint a For-Val-NH₂ peptidek eseté-



6.16. ábra. A γ_L konformáció $\{\phi, \psi\}$ adatainak ingadozása az alkalmazott energia-meghatározási módszer függvényében. Bár a módszerek befolyásolják a tényleges torziószögértékek alakulását, a változások csak mérsékelték

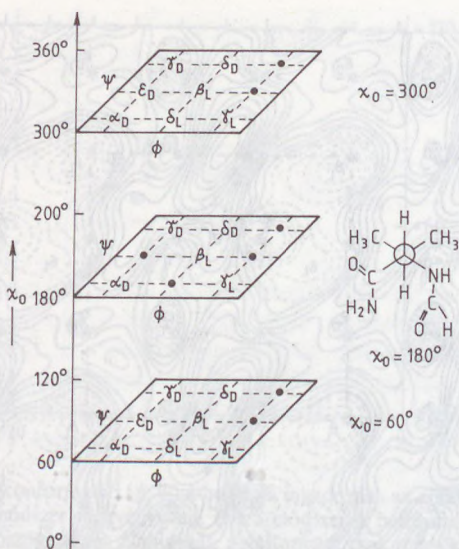
ben, amelyek az 1, 2 és 4 típusba tartozó aminosavak konformációs prototípusai (lásd 4. séma), az elvégzett *ab initio* számolások rámutattak az ε_L és az α_L konformációk annihilációjára (lásd 6.19. ábra). Történetileg elsőként több mint egy évtizede SCHAFER és mts.-ai mutattak rá [259] először az α_L konformáció anomáliás viselkedésére az alanin-diamid rendszer esetében. Ez idő tájt a megfigyelést nem követte szisztematikus vizsgálat, amely választ adhatott volna arra a kérdésre, vajon hogyan lehetséges, hogy a legelterjedtebb másodlagos szerkezeti elem, az α -hélix konformációs alegysége nemhogy nem globális minimum, de nem is minimum egyáltalán. Ez azt jelenti, hogy nem létezik mint egyensúlyi szerkezet, azaz ilyen gerinckonformációja az alanin-diamid-molekulának nincs, noha jól ismert a magas alanintartalmú peptidek intenzív hélixképző hajlama. A paradox helyzetet még érdekesebbé teszi, hogy a jobbmenetes α -hélix igen gyakori a globuláris fehérjékben, noha szerkezeti alegysége diamid szinten nem létezik. Ugyanakkor a balmenetes α -hélix nem igen ismert a természetben, pedig szerkezeti alegysége, az α_D diamid konformáció, a vizsgált királis rendszerek mindegyikében azonosítható. (Egy hasonlattal élve úgy szemléltethetnénk a helyzetet, hogy az első esetben maga az „épü-



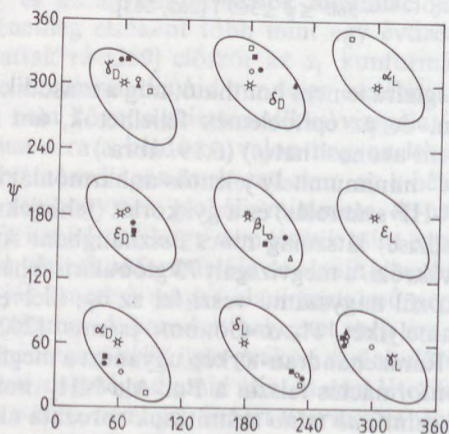
6.17. ábra. Az *N*-formil-L-alaninamid PEF-ének szintvonalas ábrázolása SCF—HF számolás alapján. Az ábrán négy teljes periódus van feltüntetve ($-360^\circ \leq \phi \leq 360^\circ$, $-360^\circ \leq \psi \leq 360^\circ$) [262, 263]

let” ismert, de téglaira le nem bontható, míg a második esetben, ha nem is gyakran, de az építőelemek fellelhetők, ám azokból az „épület” még sem azonosítható.) (6.19. ábra.)

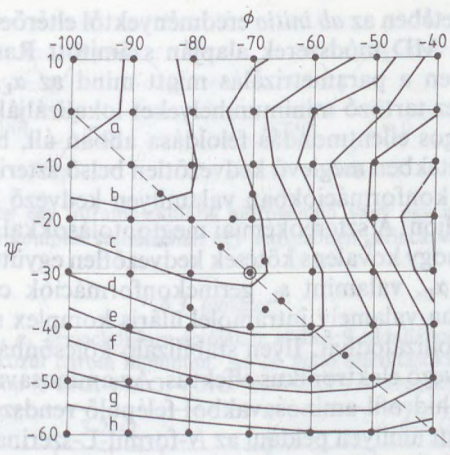
A két „eltűnt” minimumhely jelentős anharmoniót okoz, mivel az elmélet (SCF—HF számolás) és a gyakorlat (fehérjekristallográfiai adatok analízise) látszólag nincs összhangban. Amint azt az 5.3. táblázat is tükrözi, a megvizsgált 73 globuláris fehérjében talált összes alanin közül nagyszámú veszi fel az α_L , illetve az ϵ_L konformációk valamelyikét. HEAD-GORDON és mts. [262, 263] által meghatározott Ramachandran-térkép ugyanezt a megfigyelést tükrözi, ahol a konformációs felszín a For-Ala-NH₂ molekulára vonatkozó 3-21G szintű *ab initio* számítások sorozata alapján született. A PEF adott kritikus pontjainak összeolvadása minőségileg új helyzetet eredményezett, amely eltér a TKA kvalitatív jóslatától, illetve az MM és MD módszerek eredményeitől. Ugyanakkor a



6.18. ábra. Az *N*-formil-L-valinamid PEF-ének topológiai módosulása az izopropil oldallánc (χ_0) orientációjának függvényében



6.19. ábra. Kétdimenziós Ramachandran-felszín $\{E = E(\phi, \psi)\}$, amelyen az *N*-formil-glicinamid (üres négyzet), az *N*-formil-alaninamid (üres kör), valamint az *N*-formil-valinamid ($\chi_0 = 60^\circ$ [fekete négyzet], $\chi_0 = 180^\circ$ [fekete háromszög])



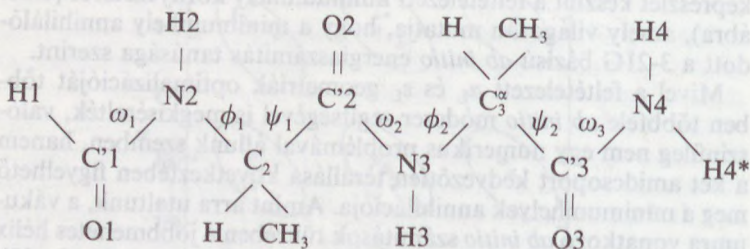
6.20. ábra. A For-L-Ala-NH₂ PEF-ének „ α -hélix” régiója. A minimumhely annihilációja figyelhető meg

meghatározott felszín (HEAD-GORDON és mts. 1989, 1991) felbontása nem alkalmas arra, hogy teljes bizonyossággal kizárjuk az α_L , valamint az ε_L gerinckonformereket, hiszen legalábbis elvileg feltételezhető, hogy a minimumot a „grid”-módszer a 30° ellépések következtében egyszerűen „átugrotta”. Ezért nagyfelbontású térképrészlet készült a feltételezett minimumhely környezetéről (6.20. ábra), amely világosan mutatja, hogy a minimumhely annihilálódott a 3-21G bázisú *ab initio* energiaszámítás tanúsága szerint.

Mivel a feltételezett α_L és ε_L geometriák optimalizációját többféle *ab initio* módszer segítségével is megkísérelték, valószínűleg nem egy numerikus problémával állunk szemben, hanem a két amidcsoport kedvezőtlen térállása következtében figyelhető meg a minimumhelyek annihilációja. Amint arra utaltunk, a vákuumra vonatkozó *ab initio* számítások tükrében a jobbmenetes hélix $-\alpha_L$, ahol $n \geq 4$, konformáció a legkisebb egységének nem tekinthetjük tehát az $-\alpha_L$ egységet. Ezért nem képzelhetjük el az α -hélix kialakulását egyszerűen az $-\alpha_L$ egységek ismétlődéseként. Ezzel teljesen rokon az $-\varepsilon_L$ problémaköre, mivel közismerten a poli-L-prolin II szerkezet gyakran megfigyelhető globuláris fehérjékben, ám a monomer $-\varepsilon_L$ itt sem létezik a megfelelő *ab initio* Ramachandran-felszínen. (Emlékeztetünk arra, hogy ugyanezen

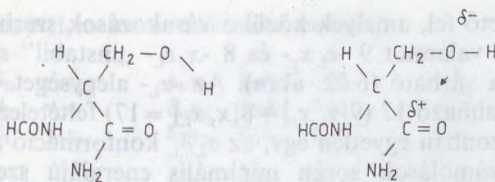
vegyületek esetében az *ab initio* eredményektől eltérően az MM (pl. ECEPP/2) és MD módszerek alapján számított Ramachandran-felszínek éppen a parametrizálás miatt mind az α_L , mind az ε_L szerkezetekhez tartozó minimumhelyeket lokalizálják.)

A látszólagos ellentmondás feloldása abban áll, hogy az α_L és ε_L térszerkezetekben meglevő kedvezőtlen belső szterikus hatást az $(\alpha_L)_n$ és $(\varepsilon_L)_n$ konformációkban valamilyen kedvező kölcsönhatás túlkompenzálja. A sztereokémiai megfontolásokkal összhangban azt találjuk, hogy kovalens kötések kedvezőtlen együttállása következtében az α_L , valamint ε_L gerinckonformációk csupán akkor létezhetnek, ha valamely intramolekuláris komplex segítségével a molekula stabilizálódhat. Ilyen stabilizáló kölcsönhatás lehet például egy kedvező elektronikus effektus. Az aminosavak 3. csoportjába tartozó hidrofil aminosavakból felépülő rendszerek esetében (4. séma), mint amilyen például az *N*-formil-L-szerinamid, konformációs lehetőség nyílik arra, hogy az oldallánc kedvező térállása következtében mind az α_L , mind az ε_L konformáció stabilizálódjon (6.21. ábra) (6.3. táblázat). Az *N*-formil-L-szerinamid esetében megfigyelt kedvező belső kölcsönhatáshoz hasonló az *N*-formil-L-alaninamid esetében nem tud kialakulni. Viszont a peptidlánc hosszának növelésével intramolekuláris hidrogénhidak kialakulására nyílik lehetőség akár már az *N*-formil-L-alanil-L-alaninamid esetében is. Így triamidrendszerek esetében (-CONH-CHR-CONH-CHR'-CONH-),



7. séma

már kedvező gerinc-gerinc kölcsönhatások kialakulása is stabilizálható akár egy α_L , akár egy ε_L alkonformációt. Korábban utaltunk arra, hogy triamid típusú molekulák (közismertebb nevükön védett dipeptidek) esetén elvileg $3^2 \cdot 3^2 = 81$ különböző gerinckonformá-



6.21. ábra. Elvileg egy intramolekuláris hidrogénhid vagy egy intramolekuláris töltésátviteli komplex stabilizálhat egy kedvezőtlen gerinckonformációt

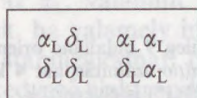
6.3. táblázat

A For-L-Ser-NH₂ α_L gerinckonformációjához elvileg 9 oldallánc orientáció tarthat, amelyek közül három minimum. Az *ab initio* számításokat 4 különböző bázison (3-21G, 4-21G, 4-21G* és 6-31G*) is elvégeztük

Konform.	3-21G			4-21G		
	α _L -g-g	α _L -ga	α _L aa	α _L -g-g	α _L -ga	α _L aa
ω1	-171,1	-169,4	-174,6	-170,0	-168,0	-174,3
φ1	-72,0	-70,5	-62,4	-79,1	-78,5	-67,5
ψ1	-23,7	-24,9	-42,8	-13,9	-13,2	-40,1
ω2	157,0	-179,8	-179,7	180,0	+179,3	-180,0
χ1	-45,6	-47,5	-179,9	-45,9	-47,0	-175,4
χ2	-77,5	-174,5	-168,7	-76,4	-171,8	-167,3
F(max)	<1E-6	<1E-6	<1E-6	<1E-6	<1E-6	<1E-6
E	-486, ,8996122	-486, ,892646	-486, ,8867149	-488, ,4867442	-488, ,4857894	-488, ,4729909
ΔE(rel.)	0,0	0,6	8,1	0,0	0,6	8,6
Konform.	4-21G*			6-31G*		
	α _L -g-g	α _L -ga	α _L aa	α _L -g-g	α _L -ga	α _L aa
ω1	-164,8	-163,6	-166,1	-166,0	-164,4	-168,9
φ1	-73,5	-71,7	-63,0	-76,8	-76,4	-69,1
ψ1	-27,3	-28,6	-45,5	-18,7	-16,8	-39,9
ω2	169,3	168,6	167,6	172,5	+171,6	171,0
χ1	-50,8	-53,0	-176,9	-52,0	-52,3	-173,3
χ2	-72,0	-177,1	-167,2	-74,6	-176,8	-165,5
F(max)	<1E-6	<1E-6	<1E-6	<1E-6	<1E-6	<1E-6
E	-488, ,7252338	-488, ,7240333	-488, ,7145330	-489, ,6273300	-489, ,6267025	-489, ,6158959
ΔE(rel.)	0,0	0,8	6,7	0,0	0,4	7,2

A torziószögek fokban, a teljes energia (E) hartree-ban, míg a relatív energia ΔE(rel.) kcal/molban van kifejezve.

ció tételezhető fel, amelyek közül a várakozások szerint 9 $-\alpha_L x_y$ - és 8 $-x_y \alpha_L$ -, valamint 9 $-\varepsilon_L x_y$ - és 8 $-x_y \varepsilon_L$ - „instabil” szerkezetek előfordulása várható (6.22. ábra). Az $-\alpha_L$ - alegységet valamilyen módon tartalmazó 17 ($9[\alpha_L x_y] + 8[x_y \alpha_L] = 17$) feltételezett szerkezet közül azonban egyetlen egy, az $\alpha_L \delta_L$ konformáció adódott az *ab initio* számolások során minimális energiájú szerkezetnek. Ugyanakkor az $\alpha_L \delta_L$ konformáció nagyfokú stabilitására hívja fel a figyelmet, hogy az α_L és a δ_L alrendszerek összes lehetséges kombinációi mind ugyanazt az $\alpha_L \delta_L$ szerkezetet eredményezik.



kezdeti szerkezetek

optimalizált konformáció

8. séma

For-L-Ala-L-Ala-NH₂ esetében azok a minimumenergiájú konformációk [lokális minimumok a $E = E(\varphi_1, \psi_1, \varphi_2, \psi_2)$ felszínen), amelyek tartalmazzák az α_L konformációs alegységet, feltételezhetően tartalmaznak egy intramolekuláris hidrogénhidat. Érdeemes megfigyelni, hogy az $\alpha_L \alpha_L$ térszerkezet a For-Ala-Ala-NH₂ modellben ugyanúgy nem minimális energiájú konformáció, ahogy az α_L térszerkezetet a For-Ala-NH₂-ban nem volt az. Ám az optimalizáció során kapott $\alpha_L \delta_L$ térszerkezet, amelyet az $\alpha_L \alpha_L \rightarrow \alpha_L \delta_L$ konformációs „elvándorlás” eredményezett, tartalmaz viszont egy intramolekuláris hidrogénhidat. A formilcsoport karbonilja és a C terminális amid egyik amid hidrogénje között kialakult hidrogénhid felelős esetleg az α_L szerkezeti egység kialakulásáért (6.23. ábra). Az $\alpha_L \delta_L$ konformáció nem más, mint az I típusú β -turn, mely szerkezet a globuláris fehérjékben, az α -helix és a β -redőzött réteg után a leggyakoribb másodlagos szerkezeti elem. Elképzelhetőnek tekinthetjük tehát, hogy az oldallán-cok minőségétől függetlenül az I típusú β -turn ($\alpha_L \delta_L$) egy stabilis szerkezet már vákuumban is, bár energetikailag lényegesen magasabb energiájú szerkezet lehet, mint a globális minimum. Ezt támasztja alá az is, hogy *ab initio* számítások alapján az akirális For-Gly-Gly-NH₂ esetében talált $\alpha_L \delta_L$ gerintorziósszögek nagy hasonlóságot mutatnak a For-Ala-Ala-NH₂ megfelelő torziósszögeihez.

A For-Ala-Ala-NH₂ molekula 91 kiindulási szerkezete

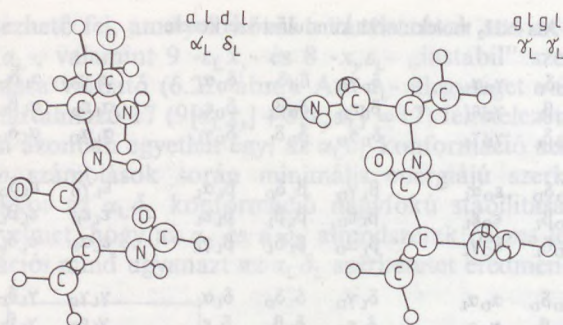
$\gamma_D \gamma_D$	$\gamma_D \delta_D$	$\gamma_D \alpha_L$	$\delta_D \gamma_D$	$\delta_D \delta_D$	$\delta_D \alpha_L$	$\alpha_L \gamma_D$	$\alpha_L \delta_D$	$\alpha_L \alpha_L$
$\gamma_D \varepsilon_D$	$\gamma_D \beta_L$	$\gamma_D \varepsilon_L$	$\delta_D \varepsilon_D$	$\delta_D \beta_L$	$\delta_D \varepsilon_L$	$\alpha_L \varepsilon_D$	$\alpha_L \beta_L$	$\alpha_L \varepsilon_L$
$\gamma_D \alpha_D$	$\gamma_D \delta_L$	$\gamma_D \gamma_L$	$\delta_D \alpha_D$	$\delta_D \delta_L$	$\delta_D \gamma_L$	$\alpha_L \alpha_D$	$\alpha_L \delta_L$	$\alpha_L \gamma_L$
$\varepsilon_D \gamma_D$	$\varepsilon_D \delta_D$	$\varepsilon_D \alpha_L$	$\beta_L \gamma_D$	$\beta_L \delta_D$	$\beta_L \alpha_L$	$\varepsilon_L \gamma_D$	$\varepsilon_L \delta_D$	$\varepsilon_L \alpha_L$
$\varepsilon_D \varepsilon_D$	$\varepsilon_D \beta_L$	$\varepsilon_D \varepsilon_L$	$\beta_L \varepsilon_D$	$\beta_L \beta_L$	$\beta_L \varepsilon_L$	$\varepsilon_L \varepsilon_D$	$\varepsilon_L \beta_L$	$\varepsilon_L \varepsilon_L$
$\varepsilon_D \alpha_D$	$\varepsilon_D \delta_L$	$\varepsilon_D \gamma_L$	$\beta_L \alpha_D$	$\beta_L \delta_L$	$\beta_L \gamma_L$	$\varepsilon_L \alpha_D$	$\varepsilon_L \delta_L$	$\varepsilon_L \gamma_L$
$\alpha_D \gamma_D$	$\alpha_D \delta_D$	$\alpha_D \alpha_L$	$\delta_L \gamma_D$	$\delta_L \delta_D$	$\delta_L \alpha_L$	$\gamma_L \gamma_D$	$\gamma_L \delta_D$	$\gamma_L \alpha_L$
$\alpha_D \varepsilon_D$	$\alpha_D \beta_L$	$\alpha_D \varepsilon_L$	$\delta_L \varepsilon_D$	$\delta_L \beta_L$	$\delta_L \varepsilon_L$	$\gamma_L \varepsilon_D$	$\gamma_L \beta_L$	$\gamma_L \varepsilon_L$
$\alpha_D \alpha_D$	$\alpha_D \delta_L$	$\alpha_D \gamma_L$	$\delta_L \alpha_D$	$\delta_L \delta_L$	$\delta_L \gamma_L$	$\gamma_L \alpha_D$	$\gamma_L \delta_L$	$\gamma_L \gamma_L$

a For-Ala-Ala-NH₂ molekula 49 stabil konformációja 3-21G HF szinten

$\gamma_D \gamma_D$	$\gamma_D \delta_D$	$\gamma_D \delta_L^*$	$\delta_D \gamma_D$	$\delta_D \delta_D$	$\delta_D \gamma_L^*$	$\delta_L \gamma_D^*$	$\delta_L \delta_D^*$	$\alpha_L \delta_L^*$
$\gamma_D \varepsilon_D$	$\gamma_D \beta_L$	$\gamma_D \varepsilon_L$	$\delta_D \varepsilon_D$	$\delta_D \beta_L$	$\delta_D \varepsilon_L$	$\delta_L \varepsilon_D^*$	$\delta_L \beta_L^*$	$\delta_L \beta_L^*$
$\varepsilon_D \alpha_D^*$	$\gamma_D \delta_L$	$\gamma_D \gamma_L$	$\delta_D \alpha_D$	$\delta_D \gamma_L^*$	$\delta_D \gamma_L$	$\delta_L \alpha_D^*$	$\alpha_L \delta_L$	$\delta_L \gamma_L^*$
$\varepsilon_D \gamma_D$	$\varepsilon_D \delta_D$	$\varepsilon_D \delta_L^*$	$\beta_L \gamma_D$	$\beta_L \delta_D$	$\beta_L \delta_L^*$	$\delta_D \gamma_D^*$	$\delta_D \delta_D^*$	$\beta_L \delta_L^*$
$\varepsilon_D \varepsilon_D$	$\varepsilon_D \beta_L$	$\varepsilon_D \gamma_L^*$	$\beta_L \varepsilon_D$	$\beta_L \beta_L$	$\beta_L \beta_L^*$	$\delta_D \varepsilon_D^*$	$\beta_L \beta_L^*$	$\beta_L \beta_L^*$
$\varepsilon_D \alpha_D$	$\varepsilon_D \delta_L$	$\varepsilon_D \gamma_L$	$\beta_L \alpha_D$	$\beta_L \delta_L$	$\beta_L \gamma_L$	$\delta_D \alpha_D^*$	$\beta_L \delta_L^*$	$\beta_L \gamma_L^*$
$\alpha_D \gamma_D$	$\alpha_D \delta_D$	$\alpha_D \delta_L^*$	$\delta_L \gamma_D$	$\delta_L \delta_D$	$\alpha_L \delta_L^*$	$\gamma_L \gamma_D$	$\gamma_L \delta_D$	$\gamma_L \delta_L^*$
$\gamma_D \varepsilon_D^*$	$\alpha_D \beta_L$	$\alpha_D \beta_L^*$	$\delta_L \varepsilon_D$	$\delta_L \beta_L$	$\delta_L \beta_L^*$	$\gamma_L \varepsilon_D$	$\gamma_L \beta_L$	$\gamma_L \varepsilon_L$
$\alpha_D \alpha_D$	$\alpha_D \delta_L$	$\alpha_D \gamma_L$	$\delta_L \alpha_D$	$\alpha_L \delta_L^*$	$\delta_L \gamma_L$	$\gamma_L \alpha_D$	$\gamma_L \delta_L$	$\gamma_L \gamma_L$

6.22. ábra. A For-Ala-Ala-NH₂ 49 stabil konformációjának konformációs kódja. Az alsó szektorban csillaggal jelölt szerkezetek (pl. $\gamma_D \delta_L^*$) elvándoroltak az optimalizáció során, amint azt például megfigyeltük a $\gamma_D \alpha_L \dots \gamma_D \delta_L$ esetében. Ez nem bizonyítja a $\gamma_D \alpha_L$ szerkezet nemlétét, csupán valószínűsíti annak hiányát. (Optimalizáció során történet minimum elhagyás, például ha a környező minimum mélyenfekvő és a gátmagasság alacsony)

Az α_L alkonformációval kapcsolatban tett megfontolások értelmében csak azok az ε_L konformációt is tartalmazó szerkezetek stabilak a For-Ala-Ala-NH₂ molekula esetében, amelyek valamilyen módon túlkompensálják az ε_L alegység kedvezőtlen karakterét. Példának okáért egy gerinc-gerinc töltésátviteli komplex stabilizálhatja a triamid szerkezetet. A $\gamma_L \varepsilon_L$ térszerkezetben bár viszonylag távol van az első alanin karbonil oxigénje a második



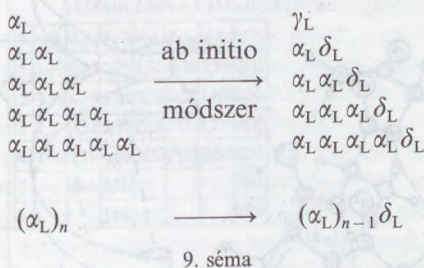
6.23. ábra. A For-Ala-Ala-NH₂ két konformációja: $\alpha_L \delta_L$ és $\gamma_L \gamma'_L$ szerkezetek

alanin karbonil szénétől (3,21 Å), mégis a kialakult gyenge töltésátviteli komplex megjelenésével a konformáció stabilizálódhat. Ilyen töltésátviteli komplexek esetében a parciális töltések pontos ismerete elengedhetetlen, amely adatok meghatározására azonban a 3-21G szintű *ab initio* számítások nem teljesen alkalmasak.

Az érdekesség kedvéért, valamint az elméleti kutatás nem öncélú jellegének bemutatása érdekében megjegyezzük, hogy az *ab initio* számítások két ez idáig ismeretlen új β -turn szerkezetet is feltártak. Globuláris fehérjékről készített röntgenkristallográfiai adatok azóta igazolták, hogy a $\gamma_L \delta_D$, valamint a $\gamma_L \alpha_D$ konformációk, amelyeket tisztán elméleti úton határoztak meg, két olyan β -turn típus, amely a természetben is előfordul.

6.4. HOSSZABB PEPTIDLÁNCOK KONFORMÁCIÓS LEHETŐSÉGEI

A számítógépek ugrásszerű fejlődése hamarosan lehetővé fogja tenni, hogy akár hosszabb peptidfragmensek *ab initio* szintű számításait is elvégezzük. Az α -hélix „felépülése” kapcsán felvetődött számos kérdésre például ma még nem ismerjük a teljesen megnyugtató választ. Ugyanakkor következetes *ab initio* számítások (9. séma) rámutattak arra, hogy a helikális [$-(\alpha_L)_n-$], valamint az I típusú β -turn [$-\alpha_L \delta_L-$] szerkezetek szoros kapcsolatban állnak. Úgy tűnik, hogy a hélixek C-terminális részeinek konformációja vákuumban következetesen az I típusú β -turn.



6.4. táblázat

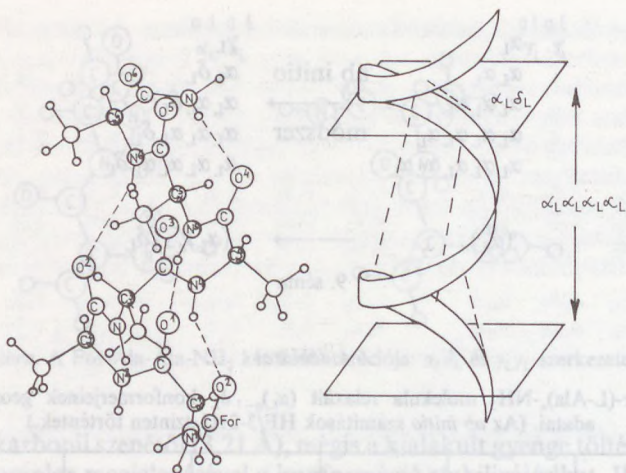
A For-(L-Ala)_n-NH₂ molekula relaxált (α_L)_{n-1}δ_L konformerjeinek geometriai adatai. (Az *ab initio* számítások HF/3-21G szinten történtek.)

n Conf.	1	2	3	4	5
φ _{n-4}					-61,4
ψ _{n-4}					-29,9
φ _{n-3}				-61,9	-65,5
ψ _{n-3}				-27,6	-14,5
φ _{n-2}			-63,5	-61,9	-48,4
ψ _{n-2}			-26,8	-21,1	-49,8
φ _{n-1}		-68,0	-71,3	-72,6	-79,7
ψ _{n-1}		-17,5	-4,6	-3,9	-1,5
φ _n	-128,1	-113,1	-105,3	-106,0	-122,1
ψ _n	+29,8	+21,3	+12,1	+13,6	+18,7
Max. erő (a. u.)	1,9 × 10 ⁻⁶	1,5 × 10 ⁻⁵	6,0 × 10 ⁻⁶	6,7 × 10 ⁻⁵	1,5 × 10 ⁻⁴
RMS erő (a. u.)	6,5 × 10 ⁻⁷	5,8 × 10 ⁻⁶	2,0 × 10 ⁻⁶	1,7 × 10 ⁻⁵	4,1 × 10 ⁻⁵

* A torziósögmértékek fokokban vannak megadva.

További érdekessége a helikális szerkezetek kialakulásának, hogy az első menet hidrogénhíd és torziósszög rendszerének (6.4. táblázat) analízise kimutatta, hogy a szerkezet jobban rokonítható a 3₁₀-hélix másodlagos szerkezeti elemmel, mint magával a tiszta 4₁₃-as α-hélix struktúrával (6.24. ábra).

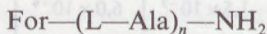
Az 1.4. ábrán bemutatott homokonformációs vagy periodikus szerkezet típusok alap gondolatát követve, a 6. fejezet 2. sémájának



6.24. ábra. A For-(L-Ala)₄-NH₂ relaxált $(\alpha_L)_3\delta_L$ konformációja

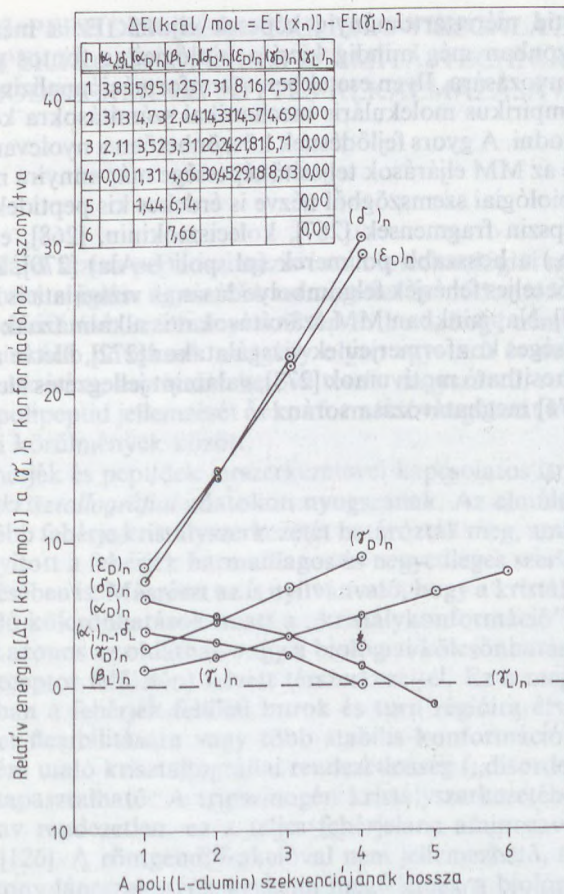
megfelelően a következő alaninból felépülő oligopeptidek konformációs viszonyait tanulmányozták.

$$\begin{array}{ccc}
 (\gamma_D)_n & (\delta_D)_n & (\alpha_L)_{n-1}\delta_L \\
 (\varepsilon_D)_n & (\beta_L)_n & \cdot \\
 (\alpha_D)_n & \cdot & (\gamma_L)_n
 \end{array}
 \quad \text{ahol } 1 \leq n \leq 6$$



10. séma

A $(\gamma_L)_n$ konformációhoz viszonyítva a relatív energiaértékek a 6.25. ábrán láthatók. Bár a 3-21G bázison számított *ab initio* energiasorrendek csak kellő óvatossággal interpretálhatók, jól látszik, hogy a polipeptid hosszának változásával a helikális szerkezetek egyre alacsonyabb energiájú minimumokká válnak. (Ez mind a jobb-, mind a balmenetes helikális szegmensre igaz.) Így a For-(L-Ala)₄-NH₂ esetében a jobbmenetes α -hélix $(\alpha_L)_3\delta_L$, amely C-terminálisan egy I típusú β -kanyarban végződik, már izoenergetikus a $(\gamma_L)_4$ konformációval, amely struktúra rövidebb peptidek esetén a globális minimum. Hasonló energiacsökkenést okoz az

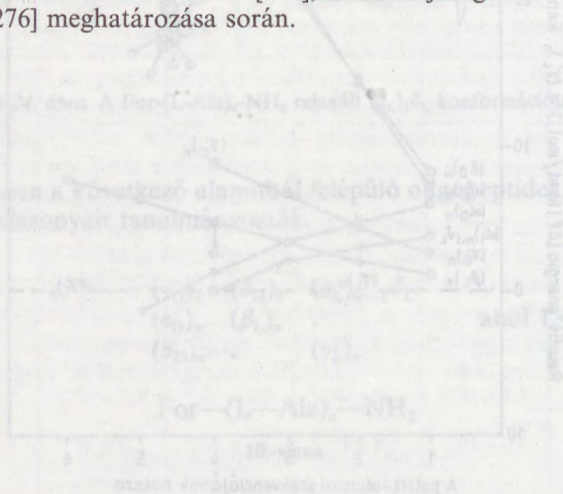


6.25. ábra. A For-(L-Ala)_n-NH₂, ahol 1 ≤ n ≤ 6, oligopeptid homokonformerjeinek relatív stabilitása a (γ_L)_n konformációhoz viszonyítva. Az egyszerű β-redőzött réteghez képest [(β_L)₄ térszerkezet], annak meghajlítása során keletkező β_Lα_Lδ_Lδ_L konformáció teljes energiája * van jelölve az ábrán

egyszerű β-redőzött réteghez képest [(β_L)₄ térszerkezet], annak meghajlítása során keletkező β_Lα_Lδ_Lδ_L konformációja (* jelölt konformáció a 6.25. ábrán), amely szerkezet középső alanil-alanin egysége egy I típusú β-turn.

Az *ab initio* számítások a jelenlegi számítógépek esetében a

hexapeptid mérettartományig képesek eljutni. Ez a mérettartomány azonban még mindig kicsi a biológiailag fontos peptidek tanulmányozására. Ilyen esetekben a konformációanalízis az aljaiban empirikus molekuláris mechanikai számításokra kénytelen támaszkodni. A gyors fejlődésnek köszönhetően a nyolcvanas évek vége felé az MM eljárások teljesítőképessége már annyira megnőtt, hogy a biológiai szemszögből nézve is érdekes kis peptidek mellett (kimotripszin fragmensek [267], kolecisztokinin, [268], enkefalin [269] stb.) a hosszabb polimerek (pl. poli(L-Ala) [270], kollagén [271]), sőt teljes fehérjék felgombolyodásának vizsgálata is lehetővé vált [235]. Napjainkban MM számításokat is alkalmaznak a fehérjék lehetséges konformerjeinek vizsgálatakor [272], illetve az azokban azonosítható motívumok [273], valamint jellegzetes alegységek [274—276] meghatározása során.



7. PEPTIDEK TÉRSZERKEZET-VIZSGÁLATA SPEKTROSKÓPIAI ÉS SZÁMÍTÁSTECHNIKAI MÓDSZEREK EGYÜTTES ALKALMAZÁSÁVAL

A szilárd fázisú peptidszintézis és a biotechnológiai módszerek általános elterjedése egyre több természetes és módosított peptid és fehérje előállítását eredményezi. Ezért érthető, hogy nem csökken, hanem inkább növekszik az igény olyan egyszerű és megbízható módszerek iránt, amelyek lehetővé teszik nagyszámú, rokon szerkezetű polipeptid jellemzését és konformációvizsgálatát különböző kísérleti körülmények között.

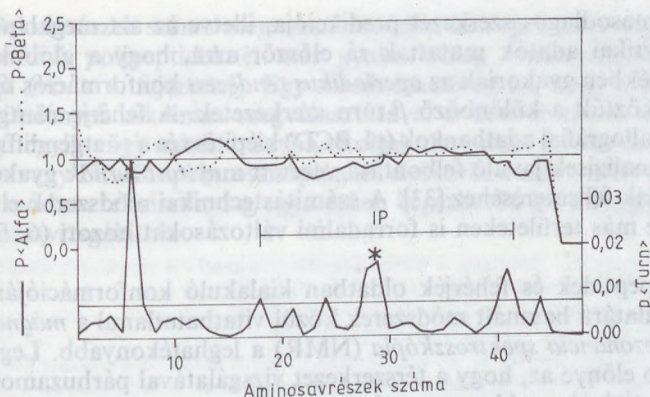
A fehérjék és peptidek térszerkezetével kapcsolatos ismereteink *röntgenkrisztallográfiai* adatokon nyugszanak. Az elmúlt években egyre több fehérje kristályszerkezetét határozták meg, ami új távlatokat nyitott a fehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezetének felderítésében is. Másrészt az is nyilvánvaló, hogy a kristályrácsban uralkodó kölcsönhatások miatt a „kristálykonformáció” nem feltétlenül azonos az oldatban vagy a biológiai kölcsönhatások során (pl. a receptor felületén) felvett térszerkezettel. Ez a megállapítás elsősorban a fehérjék felületi hurok és turn régióira érvényes. A szerkezet flexibilitására vagy több stabilis konformáció együttes jelenlétére utaló krisztallográfiai rendezetlenség („disorder”) is főleg itt tapasztalható. A tripszinogén kristályszerkezetében pl. 37 aminosav rendezetlen, ez a teljes fehérjelánc aminosavrészeinek 16%-a [126]. A röntgendiffrakcióval nem jellemezhető, többnyire mozgékony láncszakaszok gyakran megfelelnek a biológiai funkcióért felelős tartományoknak, vagy átfedésben vannak velük. A kisebb tagszámú polipeptidek (pl. peptidhormonok, peptid epitópok, enzim szubsztrátok stb.) szilárd állapotú térszerkezete alig ismert, mivel ezekből közvetlenül rendszerint nem állíthatók elő megfelelő minőségű kristályok. A kristályosodást elősegítő csoportok (általában aromás gyűrűt tartalmazó védőcsoportok) pedig módosíthatják — esetenként gyökeresen meg is változtatják — a természetes viszonyokat.

Az oldatban kialakuló konformáció vizsgálatára régóta és széles körben használják a *cirkuláris dikroizmus spektroszkópiát*. Egysze-

rű, gyors és minimális anyagmennyiséget igénylő módszer, a konformációs változások iránti érzékenysége kiemelkedő. Megbízhatóan használható a főbb konformációs típusok — elsősorban az α -hélix és β -redőzött réteg konformáció — mennyiségének, illetve arányának becslésére. A CD-spektroszkópia nem abszolút módszer. A spektrum tartalmazza az egyensúlyi konformerek és/vagy konformációs szakaszok eltérő királis környezetben levő amidcsoportjainak súlyozott kiroptikai hozzájárulását. Azonban a CD-spektrum (illetve az egyes konformációkra jellemző komponens spektrumok) nem rendelhető(k) hozzá egyedül a spektrumban rejlő információk alapján a polipeptidlánc egyik vagy másik szakaszához.

A másodlagos szerkezetek szekvenciális hozzárendelését korábban a különféle *predikciós módszerek* segítségével kísérelték meg.* A predikciós módszerek fehérjék röntgenkristallográfiai adatainak statisztikai analizisén alapulnak. Régóta tudjuk, hogy bizonyos kitüntetett másodlagos szerkezetű fehérjék néhány aminosavat az átlagosnál lényegesen nagyobb gyakorisággal tartalmaznak (pl. a β -redőzött réteg szerkezetű selyemfibroinban glicin, szerin és alanin mellett más aminosav alig fordul elő). Helikális fehérjeszakaszok glutaminsavban, metioninban és alaninban gazdagabbak az átlagosnál. Globuláris fehérjék β -redőzött réteg konformációjú szekvenciái sok valint és izoleucint tartalmaznak. A röntgendiffrakciós adatok alapján rangsorolni lehetett a fehérjealkotó aminosavakat α -hélixben és β -redőzött rétegben való előfordulási gyakoriságuk alapján. Minden aminosavhoz rendelhető egy P_α , illetve P_β érték, ezek egyszerű szabályok szerint történő összegzésével meg lehet mondani, hogy egy peptidszakasz mutat-e hajlamot hélix vagy β -struktúra felvételére. A számítások ma már személyi számítógépeken is elvégezhetőek és az eredmények grafikusán jól szemléltethetőek (7.1. ábra). A módszerek elsősorban parametrizálásban különböznek, az előfordulási gyakoriságokon nyugvó skálák mellett használnak az aminosavak hidrofil/hidrofób és egyéb mérhető és számítható tulajdonságain alapuló paramétertáblázatokat is. A predikciós módszereket széles körben használják. Nemcsak a CD-spektrumok alapján becsült százalékos α -hélix, β -redőzött réteg és

* A másodlagos szerkezet predikciójára (jóslására, pontosabban statisztikus előrejelzésére) szolgáló módszerekkel kapcsolatos több száz közleményt áttekintő munka nemrég jelent meg G. D. FASMAN szerkesztésében.



7.1. ábra. A hemagglutinin 48 aminosavból álló szegmensének másodlagos szerkezeti predikciója. A szintetikus IP (intersubunit) peptid a 18. és 42. aminosavak közötti szekvenciának felel meg. Az Arg329 helyzetét * jelöli. P<alfa>, P<béta> és P<turn> a megfelelő másodlagos szerkezetek kialakulásának valószínűsége, a küszöbérték 1,0 (fent) és 0,008 (lent) [86]

egyéb konformációs szekvenciális hozzárendelésére, hanem a másodlagos szerkezet célzott átalakítására is. A predikció alapján ki lehet választani azokat a láncszakaszokat, amelyek hasonló valószínűséggel vesznek fel pl. α -hélix és β -redőzött konformációt. (Ez azért lehetséges, mert vannak olyan aminosavak — pl. az alanin, valin és izoleucin —, amelyek globuláris fehérjékben közel egyforma valószínűséggel fordulnak elő helikális és β -láncszakaszokban.)* Néhány jól megválasztott aminosav cseréje megváltoztatja a konformációs hajlamot, és egyik vagy másik konformerpopuláció mennyiségének növelése, illetve stabilizálása révén kedvezően befolyásolhatja a receptorhoz való kötődést és ezen keresztül a biológiai aktivitást. Az *amfipatikus hélixek* predikciója a membránfehérjék vizsgálatában játszik fontos szerepet. Az amfipatikus jelleg célzott módosítása a receptorral szembeni viselkedést befolyásolhatja.

* Az ilyen peptideket az angol nyelvű szakirodalomban „switch” peptideknek hívják. A módosított peptid konformációváltozása gyakran CD-spektroszkópiával is követhető [86].

A másodlagos szerkezet predikciója, illetve az azt megalapozó statisztikai adatok mutattak rá először arra, hogy a globuláris fehérjékben gyakoriak az *aperiodikus rendezett* konformációs típusok, köztük a különböző β -turn szerkezetek. A fehérje röntgenkristallográfiai adatbankok (pl. BCD) kiépítése és a röntgendiffrakciós analízisek javuló felbontása vezetett a *nyitott turnök* gyakoriságának felismeréséhez [33]. A számítástechnikai módszerek elterjedése más területeken is forradalmi változásokat hozott (6. fejezet).

A peptidek és fehérjék oldatban kialakuló konformációjának vizsgálatára használt módszerek közül vitathatatlanul a *mágneses magrezonancia spektroszkópia* (NMR) a leghatékonyabb. Legnagyobb előnye az, hogy a térszerkezet vizsgálatával párhuzamosan a konstitúció — ebben az esetben az aminosavsorrend — meghatározását, illetve a minta tisztaságának és szerkezeti homogenitásának ellenőrzését is lehetővé teszi. A nagyfelbontású NMR készülékek és többdimenziós mérési technikák elterjedése új utakat nyitott a kisebb fehérjék szerkezetvizsgálatában (vö. a 4. fejezettel). Ma már közvetlenül tanulmányozható a kötődési folyamatok topológiája és sztereokémiája a távolságfüggés vizsgálatára alkalmas technikák (NOE, NOESY, ROESY stb.) segítségével. Az NMR gyakorlatilag az egyetlen módszer, amelynek segítségével vizsgálhatjuk a konformációs folyamatok dinamikáját és tágabb értelemben a konformációs átalakulások problémáját. Ezen a területen csak az NMR módszerek további fejlődése hozhatja meg az áttörést.

Másrészt viszont az NMR módszerek közismerten anyag- és időigényesek. Aligha várható, hogy valaha is sor kerüljön az összes biotechnológiai vagy szilárd fázisú peptidszintetikus eljárással előállított, módosított fehérje és kisebb-nagyobb peptid térszerkezetének részletes NMR jellemzésére. Az NMR módszerek viszonylag hosszú időskálája következtében mozgékony fehérjék vagy fehérjeszakaszok, de elsősorban kis peptidek esetében mindig fennáll a kiátlagolódás veszélye, ami azzal a térszerkezeti szempontból rendkívül kellemetlen következménnyel jár, hogy a mért adatokból nem lehet az egyes konformerekre, illetve konformációs régiókra következtetni, csak a konformációk „súlyozott átlagának” megfelelő térszerkezeti állapotra. Ezen elvben segíteni lehet a konformációs mozgások befagyasztásával, de mérés technikai szempontból ez egyáltalán nem kedvező, mivel így a vizsgálandó molekulák vagy

molekuláriszám megsokszorozódik, és a spektrum nagyobb tagszámú polipeptideknél már gyakorlatilag értelmezhetetlenné válik (vö. a 4. fejezettel). Egy másik lehetőség az, hogy a mérési körülmények alkalmas megválasztásával a konformációs egyensúlyt egyik vagy másik irányba eltoljuk. Itt juthat fontos szerep a CD- vagy FT-IR-spektroszkópiának, elsősorban azért, mert mindkét módszerrel viszonylag egyszerűen végezhető kis anyagigényű sorozatvizsgálatok.

1. NODDARI, M.: *Revisions a x-ray diffraction*. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 1975, 127, 1-12.

2. BRADY, P.: *Brownian Alkaline Kinetics*. *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

3. BRADY, P.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

4. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

5. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

6. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

7. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

8. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

9. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

10. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

11. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

12. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

13. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

14. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

15. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

16. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

17. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

18. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

19. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

20. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

21. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

22. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

23. LINDQVIST, K. U.: *Biophysical Journal*, 1974, 12, 1-12.

Mol. Biol. 112, 225 (1975)

IRODALOM

1. NÓGRÁDI M.: Bevezetés a sztereoekémiába, Műszaki Könyvkiadó, Budapest 1975.
2. ELŐDI P.: Biokémia, Akadémiai Kiadó, Budapest 1989.
3. BRUCKNER Gy.: Szerves Kémia I/2.
4. LINDERSTRÖMÜLANG, K. U.—SCHELLMAN, J. A.: „Protein Structure and Enzyme activity” In *The Enzyme*. 1. köt. Ed.: BOYLER, P. D. Acad. Press, New York 1959.
5. ANFINSEN, C. B.: *Science* **181**, 223 (1973).
6. PAULING, L.—COREY, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **37**, 729 (1951).
7. PAULING, L.—COREY, R.—BRANSON, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **37**, 205 (1951).
8. VENKATACHALAM, C.: *Biopolymers* **6**, 1425 (1968).
9. CHANDRASEKARAN, R.—LAKSHMINARAYANAN, A.—PANDYA, U.—RAMACHANDRAN, G.: *Biochem. Biophys. Acta* **303**, 14 (1973).
10. LEWIS, P.—MOMANY, F.—SCHERAGA, H.: *Biochem. Biophys. Acta* **303**, 211 (1973).
11. BRAHMS, S.—BRAHMS, J.: *J. Mol. Biol.* **138**, 149 (1980).
12. VANG, J. T.—WU, C.-S. C.—MARTINEZ, H. M.: In *Methods in Enzymology*, 130. köt. Acad. Press 1986.
13. APPLEQUIST, J.: *Biopolymers* **21**, 779 (1982).
14. WOODY, R. W.: In *The Peptides*, Ed.: HRUBY, V. J., Acad. Press 7. köt. 1985.
15. MANNING, C. M.—WOODY, R. W.: *Biopolymers* **26**, 1731 (1987).
16. NOGGLE, J. H.—SCHIRMER, R. E.: „The Nuclear Overhauser Effect, Chemical Applications” Acad. Press, New York 1971.
17. NEUHAUS, D.—WILLIAMSON, M.: „Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis”, Verlagsgesellschaft (VCH) Publications, 1989.
18. VASQUEZ, M.—NEMETHY, G.—SCHERAGA, H. A.: *Macromolecules* **16**, 1043 (1983).
19. BROOKS, B. R.—BRUCCOLERI, R. E.—OLAFSON, B. D.—STATES, D. J.—SWAMINATHAN, S.—KARPLUS, M.: *J. of Comp. Chem.* **4**, (2) 187 (1983).
20. HEAD-GORDON, T.—HEAD-GORDON, M.—FRISH, M. J.—BROOKS, C. III—POPLE, J. A.: *Int J. of Quantum Chemistry Quantum Biology Symposium* **16**, 311 (1989).
21. CALVIN, M.: In „Chemical Evolution”, Clarendon Press, Oxford 1969.
22. MILLER, S. L.: Production of some organic compounds under possible primitive Earth conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2351 (1954).
23. BERNSTEIN, F. C.—KOETZLE, T. F.—WILLIAMS, G. J. B.—MAYER, E. F.—BRICE, M. D. JR.—RODGERS, J. R.—KENNARD, O.—SHIMANOUCI, T.—TASUMI, M.: *J. Mol. Biol.* **112**, 535 (1977).

24. Crystallographic Database-Information Content, Software System, Scientific Applications, In „Data Commission of the Int. Union of Crystallography” ABOLA, E. E.—BERNSTEIN, F. G.—BRYANT, S. H.—KOETZLE, I. F.—WENG, J. Eds.: ALLEN, F. H.—BERGERHOFF, G.—SIEVERS, R. Bonn—Cambridge—Ches-ter, 1987.
25. KAJTÁR, M.—SURJÁN, P.—ÁNGYÁN, J.: Molekulaspektroszkópia, Akadémiai Kiadó, Budapest 1988.
26. VELLUZ, L.—LEGRAND, M.—GROSJEAN, M.: „Optical Circular Dichroism. Prin-ciples, Measurements and Applications” (J. MACCORDICK, transl.) Verleg Che-mie, Weinheim 1965.
27. KIRKWOOD, J. G.: J. Chem. Phys. **5**, 479 (1937).
28. CONDON, E. U.—ALTAR, W.—EYRING, H.: J. Chem. Phys. **5**, 753 (1937).
29. SCHELLMANN, J. A.: Acc. Chem. Res. **1**, 144 (1968).
30. MOFFITT, W.: J. Chem. Phys. **25**, 467 (1956).
31. APPLEQUIST, J.: J. Chem. Phys. **71**, 4332 (1979).
32. MANNING, M. C.—ILLANGASEKARE, M.—WOODY, R. W.: Biophys. Chem. **31**, 77 (1988).
33. SMITH, J. A.—PEASE, L. G.: CRC Crit. Rev. Biochem. **8**, 315 (1980).
34. CHOU, P. Y.—FASMAN, G. D.: Ann. Rev. Biochem. **47**, 251 (1978).
35. WOODY, R. W.: „Peptides, Polypeptides and Proteins”-ben. Eds.: BLOUT, E. R.—BOVEY, F. A.—GOODMAN, M.—LOTAN, N., Wiley, New York 1974.
36. GIERASCH, L. M.—DEBER, C. M.—MADISON, V.—NIU, C. H.—BLOUT, E. R.: Biochemistry **20**, 4730 (1981).
37. BANDEKAR, J.—EVANS, D. J.—KRIMM, S.—LEACH, S. J.—LEE, S.—MCQUIE, J. R.—MINASIAN, E.—NÉMETHY, G.—POTTLE, M. S.—SCHERAGA, H. A.—STIMSON, E. R.—WOODY, R. W.: Int. J. Pept. Protein Res. **19**, 187 (1982).
38. HOLLÓSI, M.—KAWAI, M.—FASMAN, G. D.: Biopolymers **24**, 211 (1985).
39. HOLLÓSI, M.—KÖVÉR, K. E.—HOLLY, S.—RADICS, L.—FASMAN, G. D.: Biopoly-mers **26**, 1527 (1987).
40. HOLLÓSI, M.—KÖVÉR, K. E.—HOLLY, S.—RADICS, L.—FASMAN, G. D.: Biopoly-mers **26**, 1555 (1987).
41. PERCEL, A.—HOLLÓSI, M.—FOXMAN, B.—FASMAN, G. D.: J. Am. Chem. **113**, 9772 (1991).
42. STRADLEY, S. J.—RIZO, J.—BRUCH, M. D.—STROUP, A. N.—GIERASCH, L. M.: Biopolymers **20**, 263 (1990).
43. SATHYANARAYANA, B. K.—APPLEQUIST, J.: Int. J. Peptide Prot. Res. **27**, 86 (1986).
44. FRANCIS, A. K.—IQBAL, M.—BALARAM, P.—VIJAYAN, M.: FEBS Lett. **155**, 230 (1983).
45. SUDHA, T. S.—VIJAYAKUMAR, E. U.—BALARAM, P.: Int. J. Peptide Prot. Res. **22**, 464 (1983).
46. BOVEY, F. A.—HOOD, F. P.: Biopolymers **5**, 325 (1967).
47. JENNESS, D. D.—SPRECHER, C. A.—JOHNSON, W. C. JR.: Biopolymers **15**, 513 (1976).
48. STRYER, L.: Biochemistry. W. H. Freeman and Co. New York 1988.
49. SENGUPTA, P. K.—KRIMM, S.: Biopolymers **26**, 599 (1987).
50. GLOVER, I.—HANEED, I.—PITTS, J.—WOOD, S.—MOSS, D.—TICKLE, I.—BLUN-DELL, T.: Biopolymers **22**, 293 (1983).
51. PLATT, J. R.: J. Chem. Phys. **17**, 484 (1949).

52. GREENFIELD, N.—FASMAN, G. D.: *Biochemistry* **8**, 4108 (1969).
53. CHEN, Y. H.—YANG, J. T.—CHAN, K. H.: *Biochemistry* **13**, 3350 (1974).
54. CHANG, C. T.—WU, C.-S. C.—YANG, J. T.: *Anal. Biochem.* **91**, 13 (1978).
55. BOLOTINA, I. A.—CHEKHOV, V. O.—LUGAUSKAS, V. Y.—PTITSYN, O. B.: *Mol. Biol. (Engl. Transl.)* **14**, 709 (1980).
56. PROVENCHER, S. W.—GLÖCKNER, J.: *Biochemistry* **20**, 33 (1981).
57. HENNESSEY, J. P.—JOHNSON, W. C., JR.: *Biochemistry* **20**, 1085 (1981).
58. JOHNSON, W. C., JR.: *Proteins: Structure, Function and Genetics* **7**, 205 (1990).
- 59/a. PERCZEL, A.—HOLLÓSI, M.—TUSNADY, G.—FASMAN, G. D.: *Protein Eng.* **4**, 669 (1991).
- 59/b. PERCZEL, A.—PARK, K.—FASMAN, G. D.: *Anal. Biochem.* **203**, 83 (1992).
60. ELLIOT, A.—AMBROSE, E. J.: *Nature* **165**, 921 (1950).
61. SUSI, H.: „Structure and Stability of Biological Macromolecules.” Eds.: TIMASHEFF, S. N.—FASMAN, G. D., Marcel Dekker, New York 1969.
62. SUREWICZ, W. K.—MANTSCH, H. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **952**, 115 (1988).
63. MANTSCH, H. H.—MOFFATT, D. J.—CASAL, H. L.: *J. Mol. Str.* **173**, 285 (1988).
64. SUSI, H.—BYLER, D. M.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **115**, 391 (1983).
65. KRIMM, S.—BANDEKAR, J.: *Adv. Protein Chem.* **38**, 181 (1986).
66. BYLER, D. M.—SUSI, H.: *Biopolymers* **25**, 469 (1986).
67. SUSI, H.—BYLER, D. M.: *Methods Enzymol.* **130**, 290 (1986).
68. SUREWICZ, W. K.—MANTSCH, H. H.—CHAPMAN, D.: *Biochemistry* **32**, 389 (1993).
69. LEE, D. C.—HAYWARD, J. A.—RESTALL, C. J.—CHAPMAN, D.: *Biochemistry* **24**, 4364 (1985).
70. CORTIJO, M.—ALONSO, A.—GOMEZ-FERNANDEZ, J. C.—CHAPMAN, D.: *J. Mol. Biol.* **157**, 597 (1982).
71. ARRONDO, J. L. R.—URBANEJA, M. A.—GONI, F. M.—MACARULLA, J. M.—SARZALA, G.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **128**, 1159 (1985).
72. LEE, D. C.—CHAPMAN, D.: *Biosci. Rep.* **6**, 235 (1986).
73. JAP, B. K.—MAESTRE, M. F.—HAYWARD, S. B.—GLAESER, R. M.: *Biophys. J.* **43**, 81 (1983).
74. NABEDRYK, E.—BARDIN, A. M.—BRETON, J.: *Biophys. J.* **48**, 873 (1985).
75. SUREWICZ, W. K.—MOSCARELLO, M. A.—MANTSCH, H. H.: *J. Biol. Chem.* **262**, 8598 (1987).
76. LAURSEN, R. A.—SAMIULLAH, M.—LEES, M. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2912 (1984).
77. COCKLE, S. A.—EPAND, R. M.—BOGGS, J. M.—MOSCARELLO, M. A.: *Biochemistry* **17**, 624 (1978).
78. JAWORSKY, M.—BRAUNER, J. W.—MENDELSON, R.: *Spectrochim. Acta* **42A**, 191 (1986).
79. ARRONDO, J. L. R.—MANTSCH, H. H.—MULLNER, N.—PIKULA, S.—MARTONOSI, A.: *J. Biol. Chem.* **262**, 9037 (1987).
80. MITCHELL, R. C.—HARIS, P. I.—FALLOWFIELD, C.—KEELING, D. J.—CHAPMAN, D.: *Biochim. Biophys. Acta* **941**, 31 (1988).
81. SUREWICZ, W. K.—MANTSCH, H. H.—STAHL, G. L.—EPAND, R. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7028 (1978).
82. SUREWICZ, W. K.—MANTSCH, H. H.: *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 4412 (1988).
83. SUREWICZ, W. K.—LEDY, J. J.—MANTSCH, H. H.: *Biochemistry* **29**, 8106 (1990).

84. PASTRANA, B.—MAUTONE, A. J.—MENDELSON, R.: *Biochemistry* **30**, 10058 (1991).
85. MUGA, A.—MANTSCH, H. H.—SUREWICZ, W. K.: *Biochemistry* **30**, 2629 (1991).
86. HOLLÓSI, M.—ISMAIL, A. A.—MANTSCH, H. H.—PEMKE, B.—VARADI, G.—TÓTH, G.—LACZKÓ, I.—KURUCZ, I.—NAGY, Z.—FASMAN, G. D.—RAJNAVÖLGYI, É.: *Eur. J. Biochem.* **206**, 421 (1992).
87. LACZKÓ-HOLLÓSI, I.—HOLLÓSI, M.—LEE, V. M.-Y.—MANTSCH, H. H.: *Eur. Biophys. J.* **21**, 345 (1992).
88. GREMLICH, H. H.—FRINGELI, U. P.—SCHWYZER, R.: *Biochemistry* **22**, 4257 (1983).
89. GREMLICH, H. H.—FRINGELI, U. P.—SCHWYZER, R.: *Biochemistry* **23**, 1808 (1984).
90. ERNE, D.—SARGENT, D. F.—SCHWYZER, R.: *Biochemistry* **24**, 4261 (1985).
91. PURCELL, J. M.—SUSI, H.: *J. Biochem. Biophys. Methods* **9**, 193 (1984).
92. WASACZ, F. M.—OLINGER, J. M.—JAKOBSEN, R. J.: *Biochemistry* **26**, 1664 (1987).
93. JACKSON, M.—MANTSCH, H. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **231**, 1078, (1991).
94. JACKSON, M.—MANTSCH, H. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **139**, 1118, (1992).
95. MANTSCH, H. H.—WONG, P. T. T.: *Vibr. Spectroscopy* **1**, 151 (1990).
96. SUREWICZ, W. K.—SZABÓ, A.—MANTSCH, H. H.: *Eur. J. Biochem.* **167**, 519 (1987).
97. JACKSON, M.—HARIS, P. I.—CHAPMAN, D.: *Biochemistry* **30**, 9681 (1991).
98. TREWHELLA, J.—LIDDLE, W. K.—HEIDORN, D. B.—STRYNADKA, N.: *Biochemistry* **28**, 1294 (1991).
99. ARRONDO, J. L. R.—YOUNG, N. M.—MANTSCH, H. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **952**, 261 (1988).
100. HOLLY, S.—LACZKÓ, I.—FASMAN, G. D.—HOLLÓSI, M.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **197**, 755 (1993).
101. MANTSCH, H. H.: „Spectroscopy of Inorganic Bioactivators. Theory and Applications—Chemistry, Physics, Biology and Medicine.” Ed.: THEOPHANIDES, T. Kluwer Academic Publishers (1989).
102. GORGA, J. C.—DONG, A.—MANNING, M. C.—WOODY, R. W.—CAUGHEY, W. S.—STROMINGER, J. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2321 (1989).
103. SINGH, B. R.—FULLER, M. P.—SCHIAVO, G.: *Biophys. Chem.* **46**, 155 (1990).
104. RENUGOPALAKRISHNAN, V.—DAMLE, S. P.—HOROWITZ, P. M.—MOORE, S.—HUTSON, T. B.—GREGORY, J. D.: *Biopolymers* **28**, 1923 (1989).
105. ÖTVÖS, L. JR.—THURIN, J.—KOLLAT, E.—ÜRGE, L.—MANTSCH, H. H.—HOLLÓSI, M.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **38**, 476 (1991).
106. LACZKÓ, I.—HOLLÓSI, M.—ÜRGE, L.—MANTSCH, H. H.—THURIN, J.—ÖTVÖS, L. JR.: *Biochemistry* **31**, 4282 (1992).
107. HARIS, P. I.—CHAPMAN, D.—HARRISON, R. A.—SMITH, K. F.—PERKINS, S. J.: *Biochemistry* **29**, 1377 (1990).
108. TADESSE, L.—NAZARBAGHI, R.—WALTERS, L.: *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7036 (1991).
109. LAGANT, P.—VERGOTEN, G.—FLEURY, G.—LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.-H.: *Eur. J. Biochem.* **139**, 149 (1984).
110. KENNEDY, D. F.—CRISMA, M.—TONIOLO, C.—CHAPMAN, D.: *Biochemistry* **30**, 6541 (1991).

111. TONIOLO, C.—BENEDETTI, E.: *TIBS* **16**, 350 (1991).
112. BENEDETTI, E.—DI BLASIO, B.—PAVONE, V.—PEDONE, C.—TONILO, C.—CRISMA, M.: *Biopolymers* **32**, 453 (1992).
113. BARLOW, D. J.—THORNTON, J. M.: *J. Mol. Biol.* **201**, 601 (1988).
114. DWIVEDI, A. M.—KRIMM, S.—MALCOLM, B. R.: *Biopolymers* **23**, 2025 (1984).
115. HARRIS, P. I.—CHAPMAN, D.: *biochim. Biophys. Acta* **943**, 375 (1988).
116. HOLLOWAY, P. W.—MANTSCH, H. H.: *Biochemistry* **28**, 931 (1989).
117. PRESTELSKI, S. J.—BYLER, D. M.—THOMPSON, M. P.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **37**, 508 (1991).
118. MIICK, S. M.—MARTINEZ, G. V.—FIORI, W. R.—TODD, A. P.—MILLHAUSER, G. L.: *Nature* **359**, 653 (1992).
119. ACHARYA, K. R.—STUART, D. I.—WALKER, N. P. C.—LEWIS, M.—PHILLIPS, D. C.: *J. Mol. Biol.* **208**, 99 (1989).
120. DEBER, C. M.—MADISON, V.—BLOUT, E. R.: *Acc. Chem. Res.* **9**, 106 (1976).
121. MANTSCH, H. H.—PERCZEL, A.—HOLLÓSI, M.—FASMAN, G. D.: *FASEB J.* **6**, A341 (1992).
122. MANTSCH, H. H.—PERCZEL, A.—HOLLÓSI, M.—FASMAN, G. D.: *Biopolymers* **33**, 201 (1993).
123. MANTSCH, H. H. et al.: nem közölt adatok.
124. PERCZEL, A.—MAJER, ZS.—HOLLY, S.—MACHYTKA, D.—FASMAN, G. D.—HOLLÓSI, M.: *Tetrahedron: Asymmetry* **4**, 223 (1993).
125. HOLLÓSI, M. et al.: előkészületben.
126. PRESTELSKI, S. J.—BYLER, D. M.—LIEBMAN, M. N.: *Biochemistry* **30**, 133 (1991).
- 127/a. PANCOSKA, P.—YASUI, S. C.—KEIDERLING, T. A.: *Biochemistry* **30**, 5089 (1991).
- 127/b. PANCOSKA, P.—YASUI, C. C.—KEIDERLING, T. A.: *Biochemistry* **28**, 5917 (1989).
- 128/a. WÜTHRICH, K.: „NMR of Protein and Nucleic Acids”. J. Wiley and Sons, New York (1986).
- 128/b. WÜTHRICH, K.: *J. Biol. Chem.* **265**, 22059—22063 (1990).
- 129/a. DYSON, H. J.—RANCE, M.—HOUGHTEN, R. A.—LERNER, A.—WRIGHT, E.: *J. Mol. Biol.* **201**, 161—200 (1988).
- 129/b. DAYSON, H. J.—WRIGHT, P. E.: *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **20**, 519—538 (1991).
130. WILLIAMSON, M. P.: „Methods in Molecular Biology” (ed. C. JONES, B. MULLOY és A. H. THOMAS), Humana Press, New Jersey, vol. 7 (1992).
131. WILLIAMSON, M. P.—WALTHO, J. P.: *Chem. Soc. Reviews* **227**, (1992).
132. NOGGLE, J. H.—SCHIRMER, R. E.: „The Nuclear Overhauser Effect, Chemical Applications”, Acad. Press, New York (1971).
133. NEUHAUS, D.—WILLIAMSON, M.: „The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis”, Verlagsgesellschaft (VCH) Publications, (1989).
134. WISHART, D. S.—SYKES, B. D.—RICHARDS, M.: *FEBS* **293**, 72—80 (1991).
135. WISHART, D. S.—SYKES, B. D.—RICHARDS, F. M.: *J. Mol. Biol.* **222**, 311—333 (1991).
136. WISHART, D. S.—SYKES, B. D.—RICHARDS, F. M.: *Biochem.* **31**, 1647—1651 (1992).

137. BRAUN, W.: *Quarterly Rev. of Biophys.* **19**, 115—157 (1987).
- 138a. WALTHO, J. P.—FEHER, V. A.—DYSON, H. J.—WRIGHT, P. E.: *Biochemistry* (1992).
- 138b. WALTHO, J. P.—FEHER, V. A.—WRIGHT, P. E.: *Current Research in Protein Chemistry* (VILLAFRANCA, J. J. ed.) *Accad. Press. INC.* 283—293, (1990).
- 138c. DYSON, H. J.—MERUTKA, G.—WALTHO, J. P.—LERNER, R. A.—WRIGHT, P. E.: *J. Mol. Biol.* **226**, 795—817 (1992).
- 138d. DYSON, H. J.—SAYRE, J. R.—MERUTKA, G.—SHIN, H. C.—LERNER, R. A.—WRIGHT, P. E.: *J. Mol. Biol.* **226**, 819—835 (1992).
139. BRANKI, M.—KESSLER, H.: *Chem. Ber.* **108**, 2176—2188 (1975).
140. LEWIS, P. N.—MOMANY, F. A.—SCHERAGA, H. A.: *Isr. J. Chem.* **11**, 121 (1973).
141. BENEDETTI, E.—PEDONE, C.—TONIOL, C.—NEMETY, G.—POTTLE, M. S.—SCHERAGA, H. A.: *Int. J. Peptide Protein Res.* **16**, 156—172 (1980).
142. LARIVE, C. K.—GUERRA, L.—RABENSTEIN, D. L.: *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7331—7337 (1992).
143. PERCZEL, A.—HOLLÓSI, M.—FÜLÖP, V.—KÁLMÁN, A.—SÁNDOR, P.—FASMAN, G. D.: *Biopolymers* **30**, 763—771 (1990).
144. GUERASCH, L. M.—DEBER, C. M.—MADISON, V.—NIU, C. H.—BLOUT, E. R.: *Biochemistry* **20**, 4730—4738 (1981).
145. BRUCH, M. D.—NOGGLE, J. H.—GIERASCH, L. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 1400—1407 (1985).
146. WRIGHT, P. E.—DYSON, H. J.—LERNER, R. A.: *Biochemistry* **27**, 7167—7175 (1988).
147. STRADLEY, S. J.—RIZO, J.—BRUCH, M. D.—STROUP, A. N.—GIERASCH, L. M.: *Biopolymers* **29**, 263—287 (1990).
148. PERCZEL, A.—HOLLÓSI, M.—FOXMAN, B. M.—*Soc.* **113**, 9772—9784 (1991).
149. SOHÁR P.: „Válogatott fejezetek a modern NMR-spektroszkópiából”, Akadémiai Kiadó, Budapest 1984.
150. DEBER, C. M.—TORCHIA, D. A.—BLOUT, E. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 4893—4897 (1971).
151. CERRINI, S.—GAVUZZO, E.—LUCENTE, G.—LUISI, G.—PINNEN, F.—RADICS, L.: *Int. J. Pept. Prot. Res.* **38**, 289—297 (1991).
152. FALCOMER, C. M.—MEINWALD, Y. C.—CHOUDHARY, I.—TALLURI, S.—MIBURN, P. J.—CLARDY, J.—SCHERAGA, H. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 4036—4042 (1992).
153. BANDEKAR, J.—EVANS, D. J.—KRIMM, S.—LEACH, S. J.—LEE, S.—MCQUIE, J. R.—MINASIAN, E.: G. Nemethy, M. S. Pottle, H. A. Scheraga, E. R. Stimson és R. W. Woody *Int. J. Peptide Protein Res.* **19**, 187—205, (1982).
154. STROUP, A. N.—ROCKWELL, A. L.—THEINGOLD, A. L.—GIERASCH, L. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5157—5161 (1988).
155. BACH, A. C.—GIERASCH, L. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 3349—3350 (1985).
156. BACH, A. C.—GIERASCH, L. M.: *Biopolymers* **25**, s175—s191 (1986).
157. STRADLEY, S. J.—RIZO, J.—BRUCH, M. D.—STROUP, A. N.—GIERASCH, L. M.: *Biopolymers* **29**, 263—287 (1990).
158. TORCHIA, D. A.—WONG, S. C. K.—DEBER, C. M.—BLOUT, E. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 616—620 (1972).
159. KESSLER, H.—KLEIN, M.—WAGNER, K.: *Int. J. Pept. Prot. Res.* **31**, 481—498 (1988).

160. OTTER, A.—SCOTT, P. G.—XIAHOONG, L.—KOTOVYCH, G.: *J. Biomol. Struct. and Dynam.* **7**, 455—476 (1989).
161. XIAHOONG, L.—SCOTT, P. G.—OTTER, A.—KOTOVYCH, G.: *Biopolymers* **32**, 119—129 (1992).
162. PERCZEL, A.—FASMAN, G. D.: *Protein Science* (1992).
163. CIESLA, D. J.—GILBERT, D. E.—FEIGON, J.: *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 3957—3961 (1991).
164. MORRIS, A. L.—MACARTHUR, M. W.—HUTCHINSON, E. G.—THORNTON J. M.: *Proteins: Structure, Function and Genetics* **12**, 345—364 (1992).
165. PONS, M.—GIRALT, E.: *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 5049—5050 (1991).
- 166/a. KARPLUS, M.: *J. Phys. Chem.* **30**, 11—15 (1959).
- 166/b. BYSTROV, V. F.: *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spect.* **10**, 41—82 (1976).
167. PARDI, A.—BILLETER, M.—WUTHRICH, K.: *J. Mol. Biol.* **180**, 741—751 (1984).
168. LINAS, M.—KLEIN, M. P.: *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4731—4737 (1975).
169. MARRAUD, M.—AUBRY, A.: *Int. J. Pept. Prot. Res.* **23**, 123—133 (1984).
170. OLSEN, H. B.—GESMAR, H.—LED, J. L.: *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 1456—1460 (1992).
171. LIANG, G. B.—RITO, C. J.—GELLMAN, S. H.: *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 4440—4442 (1992).
172. LIANG, G. B.—RITO, C. J.—GELLMAN, S. H.: *Biopolymers*. **32**, 293—301 (1992).
173. HOLLÓSI, M.—KÖVER, E.—HOLLY, S.—RADICS, L.—FASMAN, G. D.: *Biopolymers* **26**, 1527—1572 (1987).
174. RADICS, L.—HOLLÓSI, M.: *Tetrahedron Letters* **21**, 4531—4534 (1980).
175. KARLE, I. L.: *Acta Cryst.* **B48**, 341—356 (1992).
- 176/a. BLUNDELL, T. L.—JOHNSON, L. N.: *Protein Crystallography* (Acad. Press. New York) (1976).
- 176/b. SCHULTZ, J. M.: *Az anyagvizsgálat diffrakciós módszerei. Műszaki Könyvkiadó, Budapest* 1987.
- 177/a. KARLE, I. L.: „Peptide Structure and Biological Function” (szerkesztők: GROSS E. és MEIENHOFER, J.) Wiley, New York 681—690 (1977).
- 177/b. KARLE, I. L.: „Peptides” (szerkesztők: GROSS, E. és MEIENHOFER, J.) Acad. Press, New York 1—54 (1981).
- 177/c. KARLE, I. L.—KARLE, J.—MASTROPAOLO, D.—CAMERMAN, A.—CAMERMAN, N.: „Peptides. Structure and Function” (szerkesztők: HRUBY, V. J. és RICH, D. H.) Pierce Chem. Co., Rockford, Illinois. 291—294, (1983).
178. KAISER, E. T.—KEZDY, F. J.: *Science* **223**, 249—255 (1984).
179. WEBER, C.—WIDER, G.—VAN FREYBERG, B.—TRABER, R.—BRAUN, W.—WIDMER, H.—WÜTRICH, K.: *Biochemistry* **30**, 3563 (1991).
180. FESIK, S. W.—GAMPE, R. T.—EATON, H. L.—GEMMECKER, G.—OLEJNICZAK, E. T.—NERI, P.—HOLYMAN, T. F.—EGAN, D. A.—EDALJI, R.—SIMMER, R.—HELFRICH, R.—HOCHLOWSKI, J.—JACKSON, M.: *Biochemistry* **30**, 6574— (1991).
181. KARLE, I. L.: *Biopolymers* **28**, 1—14 (1989).
182. ROSE, G. D.—GIERASCH, L. M.—SMITH, J. A.: „Advances in protein chemistry” **37**, 1—109 (1985).
183. AUBRY, A.—MARRAUD, M.—CUNG, M. T.—PROTAS, J.: *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **280c**, 861—863 (1985).

- 184/a. BOUSSARD, G.—MARRAUD, M.—AUBRY, A.: *Int. J. Peptide, Protein Res.* **28**, 508—517 (1986).
- 184/b. BOUSSARD, G.—MARRAUD, M.—AUBRY, A.: *Biopolymers* **18**, 1297—1331 (1979).
- 184/c. BOUSSARD, G.—MARRAUD, M.: *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 1825—1828 (1985).
185. PANNEERSELVAM, K.—CHACKO, K. K.: 1990 *Int. J. Peptide, Protein Res.* **35**, 460—464 (1990).
186. BRAKMACHARI, S. K.—BHAT, T. N.—SUDHAKAR, V.—VIJAYAN, M.—RAPAKA, R. S.—BHATNAGAR, R. S.—ANANTHANARAYANAN, V. S.: *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1703—1708 (1981).
187. ANANTHANARAYANAN, V. S.—CAMERON, T. S.: *Int. J. Peptide, Protein Res.* **31**, 399—411 (1988).
188. NBEL, K.—ALTMANN, E.—MUTTER, M.—BARDI, R.—PIAZZESI, A. M.—CRISMA, M.—BONORA, G. M.—TONIOLO, C.: *Biopolymers* **31**, 1135—1148 (1991).
189. KARLE, I. L.—FLIPPEN-ANDERSON, J. L.—SUKUMAR, M.—UMA, K.—BALARAM, P.: *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 3952—3956 (1991).
190. FISHER, E.—SUZUKI, U.: *Ber.* **38**, 4173—4196 (1905).
191. FISHER, E.—JACOBS, W. A.: *Ber.* **39**, 2942—2950 (1906).
192. PAVONE, V.—LOMBARDI, A.—D'AURIA, G.—SAVINO, M.—NASTRI, F.—PAOLILLO, L.—DI BLASIO, B.—PEDONE, C.: *Biopolymers* **32**, 173—183 (1992).
193. PAVONE, V.—LOMBARDI, A.—YANG, X.—PEDONE, C.—DI BLASIO, B.: *Biopolymers* **30**, 189—196 (1990).
194. DI BLASIO, B.—LOMBARDI, A.—YANG, X.—PEDONE, C.—PAVONE, V.: *Biopolymers* **31**, 1181—1188 (1991).
195. SCHWYZER, R.—SIEBER, P.—GORUP, B.: *Chimia* **12**, 90—91 (1958).
196. PERCZEL, A.—ANGYAN, J. G.—KAJTAR, M.—VIVIANI, W.—RIVAIL, J.-L.—MARCOCCIA, J.-F.—CSIZMADIA, I. G.: *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6256—6265 (1991).
197. GETHING, M.-J.—SAMBROOK, J.: *Nature* **335**, 33—45 (1992).
198. LATTMAN, E. E.—ROSE, G. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 439—441 (1993).
199. MIRSKY, A. E.—PAULING, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **22**, 439—447 (1936).
200. AUBRY, A.—MARRAUD, M.—PROTAS, J.—NEEL, J.: *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **287c**, 163—166 (1974).
201. AUBRY, A.—MARRAUD, M.—PROTAS, J.—NEEL, J.: *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **276c**, 1089—1092 (1973).
202. AUBRY, A.: These pour Docteur et Sciences Physiques, Universite de Nancy 101—107 (1976).
203. AUBRY, A.—MARRAUD, M.—PROTAS, J.—NEEL, J.: *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **273c**, 959—961 (1971).
204. AUBRY, A.—MARRAUD, M.—PROTAS, J.—NEEL, J.: *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **287c**, 163—166 (1974).
205. AUBRY, A.—CUNG, M. T.—MARRAUD, M.: *Cryst. Struct. Comm.* **11**, 129—133 (1982).
206. AUBRY, A.—MARRAUD, M.—PROTAS, J.—NEEL, J.: *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **287c**, 697—700 (1974).
207. AUBRY, A.—PROTAS, J.—MARRAUD, M.: *Acta. Cryst.* **B33**, 2534—2439 (1977).
208. AUBRY, A.—PROTAS, J.—MARRAUD, M.—NEEL, J.: *Acta. Cryst.* **B32**, 2749—2759 (1976).

209. AUBRY, A.—MARRAUD, M.—PROTAS, J.: *Compt. Rend. Acad. Sc. Paris* **280c**, 509—512 (1975).
210. AUBRY, A.—PROTAS, J.—BOUSSARD, G.—MARRAUD, M.: *Acta Cryst.* **B33**, 2399—2406 (1977).
211. McLARFI, M.—AUBRY, A.—MARRAUD, M.: *European Biophysics J.* **14**, 43—51 (1986).
212. AUBRY, A.—PROTAS, J.—BOUSSARD, G.—MARRAUD, M.: *Acta Cryst.* **B35**, 694—699 (1979).
213. AUBRY, A.—PROTAS, J.—BOUSSARD, G.—MARRAUD, M.: *Acta Cryst.* **B36**, 321—326 (1980).
214. AUBRY, A.—BOUSSARD, G.—MARRAUD, M.: *Acta Cryst.* **B37**, 1474—1477 (1981).
215. AUBRY, A.—PROTAS, J.—BOUSSARD, G.—MARRAUD, M.: *Acta Cryst.* **B36**, 2822—2824 (1980).
216. AUBRY, A.—PROTAS, J.—BOUSSARD, G.—MARRAUD, M.: *Acta Cryst.* **B36**, 2825—2827 (1980).
217. AUBRY, A.—LECOMTE, C.—BOUSSARD, G.—MARRAUD, M.: *J. Chim. Phys. Chim. Biol.* **80**, 609—614 (1983).
218. AUBRY, A.—MARRAUD, M.: *Acta Cryst.* **C41**, 65—67 (1985).
219. AUBRY, A.—VITOUX, B.—MARRAUD, M.: *Biopolymers* **24**, 1089—1100 (1985).
220. AUBRY, A.—CUNGT, M. T.—MARRAUD, M.: *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7640—7647 (1985).
221. AUBRY, A.—GHERMANI, N.—MARRAUD, M.: *Int. J. Peptide, Protein Res.* **23**, 113—122 (1984).
222. STROUP, A. N.—COLE, L. B.—DHINGRA, M. M.—GIERACH, L. M.: *Int. J. Peptide, Protein Res.* **36**, 531—537 (1990).
223. PERCZEL, A.—FOXMAN, B. M.—FASMAN, G. D.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **89**, 8210—8214 (1992).
224. RAJ, P. A.—SONI, S. D.—RAMASUBBU, N.—BHANDARY, K. K.—LEVINE, M. J.: *Biopolymers* **30**, 73—85 (1990).
225. MEZEY, P. G.: *Chem. Phys. Lett.* **82**, 100 (1981).
226. MEZEY, P. G.: *Chem. Phys. Lett.* **86**, 562 (1982).
227. CAUCHY, A.: *Comp. Rend. Acad. Sci. Paris* 536 (1847).
228. HESTENS, M. R.—STIEFEL, E.: *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **49**, 409 (1952).
229. HESTENS, M. R.: „Conjugate Direction Methods in Optimiyation”, Springer-Verlag, New York (1980).
230. FLETCHER, R.—REEVES, C. M.: *Comput. J.* **7**, 149 (1964).
- 231/a. LIFSON, S.—HAGLER, A. T.—DAUBER, P.: *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 5111—5121 (1979).
- 231/b. POWELL, M. J. D.: *Lecture Notes in Mathematics* **1066**, 122—141 (1984).
232. HAGLER, A. T.—LIFSON, S.—DAUBER, P.: *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 5121—5130 (1979).
- 233/a. WEINER, S. J.—KOLLMAN, P. A.—CASE, D. A.—SINGH, U. C.—GHIO, C.—ALAGONA, G.—PROFETA, S. JR.—WEINER, P.: *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 765—784 (1984).
- 233/b. WEINER, S. J.—SINGH, U. C.—O'DONNELL, T. J.—KOLLMAN, P. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 6243—6245 (1984).
234. BROOKS, B. B.—BRUCCELORI, R. E.—OLAFSON, B. D.—STATES, D. J.—SWAMINATHAN, S.—KARPLUS, M.: *J. Comp. Chem.* **4**, 187—217 (1983).

- 235/a. RAMACHANDRAN, G. N.—RAMAKRISHNAN, C.—SASISEKHARAN, V.: *J. Mol. Biol.* **7**, 95—98 (1963).
- 235/b. VÁSQUEZ, M.—SCHERAGA, H. A.: *J. of Biomol. Struct. and Dynamics* **5**, 705—755 (1988).
236. NÉMETHY, G.—SCHERAGA, H. A.: *Biopolymers* **3**, 155 (1965).
237. MOMANY, F. A.—MCGUIRE, R. F.—BURGESS, A. W.—SCHERAGA, H. A.: *J. Phys. Chem.* **79**, 2361 (1975).
238. CSÁSZÁR, A.: *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992).
239. SCHAFER, F.: *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993).
240. LEWIS, N. P.—MOMANY, F. A.—SCHERAGA, H. A.: *Israel J. of Chem.* **11**, 121—152 (1973).
- 241/a. ZIMMERMAN, S. S.—POTTLE, M. S.—NEMETHY, G.—SCHERAGA, H. A.: *Macromolecules* **10**, 1— (1977).
- 241/b. ZIMMERMAN, S. S.—SCHERAGA, H. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 4126—4129 (1977).
- 241/c. ZIMMERMAN, S. S.—POTTLE, M. S.—NEMETHY, G.—SCHERAGA, H. A.: *Macromol.* **10**, 1—9 (1977).
242. ZIMMERMAN, S. S.—SCHERAGA, H. A.: *Biopolymers* **16**, 811—843 (1977).
243. ZIMMERMAN, S. S.—SCHERAGA, H. A.: *Biopolymers* **17**, 1849—1868 (1978).
244. ZIMMERMAN, S. S.—SCHERAGA, H. A.: *Biopolymers* **17**, 1886—1890 (1978).
245. ZIMMERMAN, S. S.—SCHERAGA, H. A.: *Biopolymers* **17**, 1871—1884 (1978).
246. PERCEL, A.—MCALLISTER, M. A.—CSASZAR, P.—CSIZMADIA, I. G.: *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4849—4858 (1993).
247. RENOUPALAKRISHNAN, V.—REIN, R.: *Biochem. Biophys. Acta (BBA 37292)* **164**—168 (1976).
248. JORGENSEN, W. L.—GAO, J.: *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 4212—4216 (1988).
249. ATAKA, S.—TAKEUCHI, H.—TASUMI, M. J.: *J. Mol. Struct.* **113**, 147 (1984).
250. DRAKENBERG, T.—FORSÉN, S.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1404 (1971).
251. ZIMMERMAN, S. S.—SCHERAGA, H. A.: *Macromol.* **9**, 408 (1976).
252. HSIANG-AI, Y.—PETTIT, M.—KARPLUS, M.: *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 2425—2434 (1991).
253. MAPLE, J. R.—DINUR, U.—HAGLER, A. T.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 5350—5354 (1988).
254. SELLERS, H. L.—SCHAFER, L.: *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 7728—7729 (1978).
255. SCHAFER, L.—SELLERS, H. L.—LOVAS, F. J.—SUENRAM, R. D.: *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 6566—6568 (1980).
256. BONACCORSI, R.—PALLA, P.—TOMASI, J.: *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1945—1950).
257. SUKUMAR, N.—SEGAL, G. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 6880—6884 (1986).
258. SCHAFER, L.—VAN ALSENOY, C.—SCARSDALE, J. N.: *J. Chem. Phys.* **76**, 1439—1444 (1982).
259. SCHAFER, L.—KLIMOWSKI, V. J.—MOMANY, F. A.—CHUMAN, H.—VAN ALSENOY, C.: *Biopolymers* **23**, 2335—2347 (1984).
260. KLIMOWSKI, V. J.—SCHAFER, L.—MOMANY, F. A.—VAN ALSENOY, C.: *J. Mol. Struct.* **124**, 143—165 (1985).
261. SCARSDALE, J. N.—VAN ALSENOY, C.—KLIMOWSKI, V. J.—SCHAFER, L.—MOMANY, F. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3438—3445 (1983).
262. HEAD GORDON, T.—HEAD GORDON, M.—FRISH, M. J.—BROOKS II, C.—POPLE, J. A.: *Int. J. Quantum Chem. Quantum Biology Symposium* **16**, 311—319 (1989).

263. HEAD GORDON, T.—HEAD GORDON, M.—FRISH, M. J.—BROOKS II, C.—POPLE, J. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 5989—5997 (1991).
264. SIAM, K.—KLIMKOWSKI, V. J.—VAN ALSENOY, C.—EWBANK, J. D.—SCHAFFER, L.: *J. Mol. Struct.* **152**, 261—270 (1987).
265. SIAM, K.—KULP, S. Q.—EWBANK, J. D.—SCHAFFER, L.—VAN ALSENOY, C.: *J. Mol. Struct.* **184**, 143—157 (1989).
- 266/a. Analytic Equations for Conformational Energy Surfaces in „Progress of Theoretical Organic Chemistry”; PETERSON, M. R. and CSIZMADIA, I. G. (*Elsevier*) **3**, 190—266 (1982).
- 266/b. Potential Energy Hypersurfaces; MEZEY, P. G. Eds.; Elsevier Science Publishers (1987).
- 266/c. Multidimensional Theoretical Stereochemistry and Conformational Potential Energy Surface Topology in „New Theoretical Concept for Understanding Organic Reactions”; CSIZMADIA, I. G.; BERTRAN, J. D. Eds. Reidel: Publishing Co. 1—31, (1989).
267. HOWARD, J. C.—ALI, A.—SCHERAGA, H. A.—MOMANY, F. A.: *Macromol.* **8**, 607—622 (1975).
268. WOLFE, S.—BRUDER, S.—WEAVER, D. F.—YANG, K.: *Can. J. Chem.* **66**, 2703—2714 (1988).
269. PAINE, G. H.—SCHERAGA, H. A.: *Biopolymers* **25**, 1547—1563 (1986).
270. RIPOLL, D. R.—SCHERAGA, H. A.: *Biopolymers* **27**, 1283—1303 (1988).
271. NÉMETHY, G.—MILLER, M. H.—SCHERAGA, H. A.: *Macromol.* **13**, 914—919 (1980).
272. SCHULZ, G. E.: *Ann. Rev. Biophys., Chem.* **17**, 1—21 (1988).
273. BRUCCOLERI, R. E.—KARPLUS, M.: *Biopolymers* **26**, 137—168 (1987).
274. LAMBERT, M. H.—SCHERAGA, H. A.: *J. Comp. Chem.* **10**, 798—816 (1989).
275. LAMBERT, M. H.—SCHERAGA, H. A.: *J. Comp. Chem.* **10**, 770—798 (1989).
276. LAMBERT, M. H.—SCHERAGA, H. A.: *J. Comp. Chem.* **10**, 817—831 (1989).
277. KITAMO, M.—FUKUYAMA, T.—KUCHITSU, K.: *Bull. Chem. Soc. Jap.* **46**, 384— (1973).
278. NÉMETHY, G.—MILLER, M. H.—SCHERAGA, H. A.: *Macromol.* **13**, 914—919 (1980).



Ára: 363,- Ft 10% áfával

A KÉMIA ÚJABB EREDMÉNYEI

77. kötet

SZERKESZTI

CSÁKVÁRI BÉLA

Perczel András, Laczkó Ilona és Hollósi Miklós professzor „Peptidek térszerkezet-vizsgálata” című monográfiája a természetes peptidek térbeli szerkezetének, konformációjának vizsgálatával foglalkozik a modern műszeres mérések (cirkuláris dikroizmus, Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia, mágneses magrezonancia-spektroszkópia) szerint csoportosítva. A téma nagyon is aktuális, a konformáció ismerete példaképpen a peptidek biológiai hatásának molekuláris szinten történő értelmezéséhez is nélkülözhetetlen. A könyv a természettudományok széles spektruma területén dolgozó szakemberek és doktoranduszok érdeklődésére számíthat.

ISBN 963 05 6774 1

A kéremia újabban eredményei

508622

77