

Náray-Szabó Gábor

CHINOIN Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyára

ELEKTROSZTATIKUS POTENCIÁLTÉRKEPEK A KÉMIÁBAN ÉS
A BIOKÉMIÁBAN

akadémiai doktori disszertáció

Budapest, 1982

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Módszer: a kötésjárulék-közelítés	8
2.1. Alapfeltevések	9
2.2. Összevetés más módszerekkel.	18
2.3. Általánosítás nukleofil reakciókra	26
3. Kémiai alkalmazások	31
3.1. Elektrosztatikus téreffektus α, ω -di- aminokarbonsavak protonálódásánál.	31
3.2. Elektrosztatikus téreffektus 1,3,4- -trisubsztituált maleinimidek gyűrű- felnyílásánál.	38
3.3. Egyéb alkalmazások	44
4. Biokémiai alkalmazások.	51
4.1. Szerin-proteázok működési mechanizmusa	52
4.2. Protonátmeneti egyensúly a szubtilizin His-64...Asp-32 diádjában.	55
4.3. Reakciósebesség-növelő tényezők a sze- rin-proteázok működésénél.	65
4.4. Ellenionok szerepe az enzimkatalizis- ben.	77
Köszönetnyilvánítások.	83
Irodalom	84

1. Bevezetés

A kémiai reakciómechanizmusok elméleti tárgyalása a kvantumkémia legnehezebb feladatai közé tartozik. Még ha el is fogadjuk azt a közelítést, mely sokváltozós energiafelületen történő elmozdulással modellezi a molekulák kölcsönhatását és átalakulását, számos problémával kell szembenéznünk. A reakcióút, az energiafelület kiindulási és végpontját összekötő, a lehető legkisebb energiabefektetéssel végigjárható görbe meghatározása bonyolultabb rendszerek esetében rendkívüli elvi és számítástechnikai nehézségekkel járhat /1/. Érthető, hogy számos kísérletet tettek az egyszerűsítésre. Elterjedten alkalmazzák azt a modellt, mely a reagáló molekulák egyikét, rendszerint a kisebbet, pontszerűnek tekinti és az átalakulás jellemző vonásait a másik molekula megfelelően definiált reakcióképességéből (pl. töltéseloszlásából) igyekszik meghatározni /2/. Ez a közelítés jól használható például az elektrofil és a nukleofil szubsztitúciós reakciók esetében. Egyik jelentős hátránya azonban az, hogy nem alkalmas a térbeli jelenségek tárgyalására.

A molekulák töltéseloszlását alapul vevő modell továbbfejlesztése Scrocco és Tomasi nevéhez fűződik

/3-4/. Elektrofil szubsztitúciós reakciók esetében a pontszerű pozitív töltésű reaktáns a reakcióba lépő molekula azon részei felé közelít leginkább, amelyekről származó elektrosztatikus potenciál a legnegatívabb. Ezekben a helyeken lesz ugyanis a kölcsönhatási energia a legnegatívabb, tehát a két reagáló molekula összekapcsolódásának a valószínűsége a legnagyobb. Az elektrosztatikus potenciál a molekula hullámfüggvényének ismeretében gyorsan kiszámítható a tér tetszőleges szerinti pontjában. Így térképet szerkeszthetünk, mely alkalmas például a protonálódási reakció lehetséges lefutási irányának, a proton legvalószínűbb támadási helyének meghatározására. Egy ilyen elektrosztatikus potenciáltérképnek az az előnye számítástechnikai szempontból, hogy meghatározásához elég csupán egyszer kiszámítani a reagens hullámfüggvényét. Ez ugyanis jelentős, még a legegyszerűbb kvantumkémiai módszerek alkalmazása esetében is a molekula elektronszámának körülbelül a harmadik hatványával növekvő számítási munkát igényel.

A számítási munka rohamos növekedése folytán az elektrosztatikus potenciáltérképek meghatározása a hagyományos módszerrel 100-120 elektronnál többet tartalmazó molekulák esetében rendkívül költséges,

sőt az elektronszám növekedésével egyre inkább megvalósíthatatlan feladatot jelent. Növeli a nehézségeket az is, hogy a széles körben elterjedt szemiempirikus módszerek (CNDO, MINDO, stb.) olyan elhanyagolásokat tartalmaznak, melyek következtében - néhány esettől eltekintve - alkalmatlanok a potenciáltérképek megbízható becslésére /5/. A pontosabb ab inició módszerekkel végzett számítások nagyságrendekkel több gépidőt igényelnek. A vázolt problémák áthidalására Bonaccorsi, Scrocco és Tomasi kötési járulékokból számította ki a potenciált /6/, melyek ponttöltések megfelelő rendszerével állíthatók elő. Néhány egyszerű modellre végzett számítás alapján kimutatták, hogy az elektrosztatikus potenciál járulékai σ -kötéseket tartalmazó molekulák között igen pontosan átvihetők. A ponttöltés-járulékok meghatározhatók szubsztituált benzolszármazékokra is /7/, azonban bonyolultabb π -rendszerek esetében nem valószínű, hogy kiszámításukra általánosan alkalmazható módszert lehet találni. Fentiekén kívül még számos szerző foglalkozott az elektrosztatikus potenciál, illetve kölcsönhatási energia közelítő számításával /8/, széles körben alkalmazott módszert azonban nem sikerült kidolgozni.

A következő fejezetekben új, gyors, közelítő módszert mutatok be, mellyel igen nagy, néhány ezer

atomot tartalmazó molekulák elektrosztatikus potenciáltérképe is aránylag egyszerűen meghatározható. Nem törekedtem, nem is törekedhettem ilyen nagy rendszereknél az ab inició módszerekkel kapott számértékek reprodukálására, a súlyt a változások helyes visszaadására fektettem. Másszóval, céлом az volt, hogy a közelítő potenciáltérkép segítségével megbízhatóan különbséget tehessek hasonló rendszerek potenciálja és ennek révén reakciósebessége között. A javasolt módszer lényege az, hogy Bonaccorsi, Scrocco és Tomasi gondolatmenetének megfelelően az elektrosztatikus potenciált kötési járulékokból, mint "építőkövekből" állítja elő. Ezáltal a számítási munka a vegyértékelektronok számának csak az első hatványával arányos, a módszer alapján irt számítógépes program kisebb komputeren is nehézség nélkül működtethető.

Az elektrosztatikus potenciáltérképek igen gyors és egyszerű meghatározása lehetővé tette néhány elméleti szerves kémiai és biokémiai probléma tárgyalását új szemszögből. A módszer alapján megbízhatóan különbséget lehet tenni a szubsztituensek elektrosztatikus és induktív térhatása (field effect) között. Az elektrosztatikus szubsztituens-hatás igen fontos szerepet játszik például α, ω -di-

-aminokarbonsavak protonálódási egyensúlyánál gázfázisban és 1,3,4-triszubsztituált maleinimidek gyűrfelnyílásánál. Ez a hatás valószínűleg döntő a szerin proteázok katalizálta peptidhidrolizis sebességnövekedésénél. Ujabban egyre több adat gyűlik össze arra vonatkozóan, hogy a fehérjék által létrehozott elektrosztatikus tér szerepe alapvető a biokémiai reakciók mechanizmusában /9/. A potenciál gyors és egyszerű kiszámítása révén tehát közelebb kerülhetünk számos fontos életfolyamat lényegének megértéséhez.

2. Módszer: a kötésjárulék-közelítés

Ha egy viszonylag nagy molekula, A, elég távol van egy vele reakcióba lépő B reagenstől, kölcsönhatási energiájuk az alábbi egyszerű kifejezéssel közelíthető:

$$E_{AB} = \sum_k V_A(k) q_{kB}(k) \quad (1)$$

ahol $V_A(k)$ az A molekulától származó elektrosztatikus potenciál a B reagens k atomjának helyén, q_{kB} pedig az atomtöltés. Az (1) egyenlet kisebb távolságokban is jó közelítés marad, ha nemcsak az atommagok helyén, hanem a molekula más részein, pl. kötéseit mentén is megfelelően definiált ponttöltéseket helyezünk el /3/. Az elektrosztatikus potenciál fizikailag mérhető mennyiség, a tér \underline{r} vektorral megadott pontjában a következőképpen számítható ki:

$$V_A(\underline{r}) = -\int \frac{\Psi_A(\underline{r}') \Psi_A^*(\underline{r}')}{|\underline{r} - \underline{r}'|} d\underline{r}' + \sum_m \frac{Z_m}{|\underline{r} - \underline{R}_m|} \quad (2)$$

ahol az első tag az elektronoktól, a második az atommagoktól származik. Ψ_A az A molekula hullámfüggvénye, Z_m az m -edik mag töltése, \underline{R}_m a helyvektora. A potenciáltérkép megszerkesztéséhez tehát a hullám-

függvényt kell ismernünk, ennek kiszámítása jelenti a döntő problémát.

2.1. Alapfeltevések

Ab inició módszerek esetében Ψ_A meghatározása az elektronszám negyedik hatványával arányos számítási munkát igényel. Bár a bevett szemempirikus közelítésekkel ez a munka nagyságrendekkel csökkenthető, alkalmazásuk száznál több atomot tartalmazó molekulák esetében reménytelennek látszik.

Fenti probléma áthidalása végett közelítsük a zárt héju A molekula hullámfüggvényét a következő determinánssal

$$\Psi_A = \det |\varphi_i(j)| \quad (3)$$

ahol φ_i szigoruan lokalizált kötéspályákat jelent. Ezek alakja σ -kötések, magányos párok és π -kötések esetében rendre a következő /10-12/

$$\varphi_i^\sigma = c_{ai} h_{ai} + c_{bi} h_{bi} \quad (4a)$$

$$\varphi_i^{lp} = h_{ai} \quad (4b)$$

$$\varphi_i^\pi = \sum_{m=1}^M c_{mi} u_{mi}^{2pz} \quad (4c)$$

A kötéspályák tehát szigoruan az a és a b atomra lokalizálódnak az (ab) σ -kötésnél, egyedül az a atomra magányos párnál és az 1, 2, ... M_π atomokra delokalizált π -kötésnél. A kötéspályák centrumait képező atomok pályáról-pályára mások lehetnek, ugyanigy változhat a π -kötéspálya centrumainak a száma, M_π is. A (4a-c) egyenletekben h_{ai} normált hibridpályát jelent az a atomon

$$h_{ai} = b_i^{2s} u_a^{2s} + b_i^{2px} u_a^{2px} + b_i^{2py} u_a^{2py} + b_i^{2pz} u_a^{2pz} \quad (5)$$

A (4c) és az (5) egyenletben szereplő u_a^{2s} , u_a^{2px} , u_a^{2py} és u_a^{2pz} a megfelelő szimetriájú, normált Slater-pályákat jelölik. Ha a (4a) egyenlettel definiált σ -kötéspályában b hidrogénatom, akkor h_{bi} 1s-típusu Slater-pálya

$$h_{bi} = u_H^{1s} \quad (6)$$

A c együtthatók a kötés polaritását, végső soron a molekula töltéseloszlását, b_i^{2s} a hibridpálya s-jellegét, b_i^{2px} , b_i^{2py} és b_i^{2pz} pedig az irányát szabják meg. Tételezzük föl, hogy a fenti paraméterek hasonló típusu molekulák között átvihetők, értéküket egyszer s mindenkorra meghatározhatjuk. Ez megfelel a kémiai kötés klasszikus "építőkocka" fogalmának: a C-, N-, O-, F- és H-atomokat tartalmazó, zárt héju

molekulák tulnyomó részének viselkedése alkalmasan definiált kötéstulajdonságok segítségével leírható.

A kötéspályákból a (3-6) egyenletek szerint felépített hullámfüggvényt a (2) egyenletbe helyettesítve az elektrosztatikus potenciál a következő lesz:

$$V_A(\underline{r}) = -2 \sum_{i,j=1}^n T_{ij} \int \frac{\varphi_i(\underline{r}') \varphi_j(\underline{r}')}{|\underline{r} - \underline{r}'|} d\underline{r}' + V_m \quad (7)$$

ahol n a betöltött pályák száma, T_{ij} az

$$S_{ij} = \int \varphi_i(\underline{r}') \varphi_j(\underline{r}') d\underline{r}' \quad (8)$$

elemekkel definiált S átfedési mátrix T inverzének (ij) eleme. V_m a (2) egyenlet második tagja, a potenciál magoktól származó része. Bevezetve a $T_{ij} = \delta_{ij}$ közelítést és elhanyagolva a háromcentrumos integrálokat, továbbá a nehéz atomok $1s$ -pályáihoz rendelhető elektronokat a magba nyomva a következő kifejezést kapjuk

$$V_A(\underline{r}) \approx -2 \sum_{i=1}^{n'} \sum_{m=1}^{M_i} c_{mi}^2 \sum_{\alpha} (b_i^{\alpha})^2 \int \frac{u_m^{\alpha}(\underline{r}') u_m^{\alpha}(\underline{r}')}{|\underline{r} - \underline{r}'|} d\underline{r}' + \sum_{m=1}^M \frac{z_m^{eff}}{|\underline{r} - \underline{R}_m|} \quad (9)$$

n' és M_i a betöltött vegyértékpályák és az i -edik kötéspálya centrumainak száma, $\alpha = 2s, 2p_x, 2p_y$ vagy

$2p_z$. z_m^{eff} az effektív magtöltésszám, $z_m^{eff} = 1$, ha $m = H$ és $z_m^{eff} = z_m - 2$ egyébként. A levezetésnél kihasználtam azt, hogy az eltérő szimmetriájú hibridpályák (pl. $2s-2p_x$) szorzatával képzett magvonzási integrálok zérussal egyenlők, ezért a (9) egyenlet első tagjának legbelső szummájában vegyes tagok nem lépnek föl. A szumma alatti integrálokat analitikus alakban írhatjuk föl /13/, így szerepelnek az ELPO programban is, mely a potenciált a (9) egyenlet alapján számítja ki /14/.

Az átvihető kötéspolaritások javasolt értékeit H-, C-, N-, O-, F-, P-, S- és Cl-atomokat tartalmazó molekulákra az I. táblázat mutatja. A c_{mi} együtthatókat kis modellmolekulákra végzett CNDO/2 /12, 15/, illetve PCIO /16, 17/ számítások alapján határoztuk meg, kihasználva a polaritások és a pályaeponensek közötti lineáris összefüggést /12, 18/. A hibridpályák s -jellegét, a b_i^{2s} együttható nagyságát a kémiai szemlélet szolgáltatja. Ha a pálya centrumát képező atomhoz csak σ -kötések vagy magányos párok tartoznak (pl. C-atom az etánban, O-atom a vízben), $b_i^{2s} = 0,25$, vagyis sp^3 hibridpályát kell venni. Ha a centrumhoz π -kötés is tartozik (pl. C-atom az etilénben, O-atom a formaldehidben) $b_i^{2s} = 0,33$ (sp^2 hibridizáció). σ -típusú kötéspályákban szereplő hibridek irányát ($a b_i^{2px}$, b_i^{2py} és b_i^{2pz} együtthatókat)

I. táblázat. Átvihető kötéspolaritások javasolt értékei

A-H kötés		A-B kötés	
C-H	0,500	X-X	0,500
N-H	0,539	C-N, N-O, O-F	0,462
O-H	0,579	C-O, N-F	0,424
F-H	0,619	C-F	0,385
P-H	0,506	C-P	0,502
S-H	0,552	C-S	0,466
Cl-H	0,598	C-Cl	0,431
		P-N	0,444
		P-O	0,391
		P-F	0,337
		S-N	0,480
		S-O	0,426
		S-F	0,373

a kötéshez tartozó másik atom jelöli ki. Magányos párok esetében a kémiai szemléletnek megfelelő, egyszerű szabályok alapján határozható meg az irányítás /12/. Így például az NH_3 -molekulában a magányos pár a forgástengelybe esik, a víz esetében a két magányos pár a tükörsíkban van, a molekula síkjára szimmetrikus elrendezésben és egymással $109,47^\circ$ -os, tetraéderes szöget zárnak be. Karbonil-csoportnál az oxigén magányos párjai a C-O-kötésre szimmetrikusak és 120° -os szöget zárnak be egymással.

Látható, hogy V_{α} kiszámítása a közelítő (9) egyenlettel a betöltött vegyértékpályák számának csak az első hatványával arányos munkát igényel, így az ELPO program /14/ igen egyszerű és gyors. Bemenő adatai a következők. Meg kell adni a centrumok (az atomok, valamint a magányos párok irányítását kijelölő pontok) derékszögű koordinátáit, a különböző kötésekhez tartozó centrumok sorszámát és a π -pályák együtthatóit. Ez utóbbiakat például CNDO/2 számítások alapján kaphatjuk. Az ELPO legfeljebb 600 centrumot és 500 kötést tartalmazó molekulára alkalmazható. Különleges változata legfeljebb 5000 centrumot tartalmazó fehérjemolekulától származó potenciál kiszámítására képes /19/. Ez a program bemeneti adatként csak a Protein Data Bank /20/ által szabályszerű sorrendben megadott nehéz atomok koordinátáit igényli, a kötések és a magányos párok centrumait maga jelöli ki. Az ELPO programmal egy 280 pontból álló potenciáltérkép kiszámítása az α -kimotripszin aktiv helyének 286 centrumot tartalmazó modelljére a CHINOIN Számítóközpont ODRA 1305-ös gépén 70 percet vesz igénybe. A PROTPOT programmal ugyanezen a gépen a 245 aminosavat tartalmazó α -kimotripszintől származó potenciál egy pontban 4 perc alatt számítható ki.

Tekintsük most át a bevezetett közelítések és elhanyagolások hatását a potenciál számértékére. Összehasonlítási alapul az ab inició módszerrel, STO-3G minimális bázissal számított értékek szolgálnak. Mivel a potenciál egyelektron-tulajdonság, nem valószínű, hogy a Hartree-Fock közelítés alkalmazása lényeges hibát okozna a kiszámításában /21/. A minimális bázis használata kisebb eltérésekhez vezethet /3-5/, ezek azonban nem döntőek a jelen dolgozatban tárgyalt problémák esetében. Itt az elektrosztatikus potenciált a kémiai reakcióképesség leírására használom. Ez, mint említettem, csak megfelelő korlátok között jogos, nem érdemes tehát a potenciál értékének számításánál túlzott pontosságra törekedni. Ugyancsak nem lehet lényeges az sem, hogy a (4) egyenletben definiált kötéspályák milyen mértékben lokalizáltak. Bár a Hartree-Fock-Roothaan egyenletek megoldásából kapott, kanonikus pályák nem lokalizálhatók tökéletesen, a megfelelő kötés atomjain kívül másokon is vannak "farkaik", ezek általában kicsinyek. Részesedésük a kötéshez rendelhető elektronsűrűségből σ -kötések esetében 1 %, magányos pároknál 5 % alatt van /18/.

A CNDO/2 és PCILO módszerrel kapott c_{mi} kötés-polaritások átvihetősége X-H kötések esetében

és telített molekulák X-Y kötéseinél (X, Y = C, N, O, P, S) jó /12, 16/. Rossz azonban az átvihetőség telítetlen rendszerek σ -váza esetében /12/, ez valószínűleg a σ - π kölcsönhatás következménye. Szerencsére az eltérések hatása a potenciál változásának irányzatára nem jelentős. Ha például az 1. ábrában feltüntetett potenciálértékek számításánál valamennyi X-Y kötés polaritását 0,5-tel vesszük egyenlőnek, ami elég durva egyszerűsítés, alig változik meg a regressziós egyenes iránytényezője /12/. Az (5) hibridpályák s-jellege, b_i^{2s} CNDO/2 számítások szerint nem vihető át, ez azonban alig befolyásolja a potenciált. NH_3 esetében sp^3 , illetve sp^2 hibrideket használva a magányos párok kijelölésénél ($b_i^{2s} = 0,25$, illetve $0,33$) a potenciál értéke -490-ről -506-ra, csak 16 kJ/mol-lal változik a minimumban. Ugyancsak nem lényeges a potenciál függése a magányos pár irányításától, ha egy atomhoz csak egy tartozik, mint például a metilaminban, mert csak a minimum helye változik, a számérték eltérése kicsi. Igen nagy a hiba azonban két magányos párt hordozó atomok esetében. Ha a vízmolekulában az oxigén magányos párjainak egymással bezárt α szöge $5-6^\circ$ -kal változik, az eltérés akár 100 kJ/mol is lehet. Feltételezve, hogy az O-H távolság 96 pm és a HOH kö-

tésszög 105° , $\alpha = 109,47^\circ$ esetében a minimum -480 kJ/mol, míg ha $\alpha = 114^\circ$, ez csak -387 kJ/mol. A magányos párok irányításának átvihetősége nem tulságosan jó /12/, ez lehet az oka például annak, hogy az ammóniamolekula körül kialakuló potenciál-minimum a kötéspálya-módszerrel számítva nagyobb, mint a metilaminé, míg az. ab inició számítások STO-3G gázissal éppen ennek az ellenkezőjét adják.

A (7) mennyiség számításánál alkalmazott $T_{ij} = \delta_{ij}$ közelítés, valamint a háromcentrumos integrálok elhagyása megfelel a bevett CNDO/2 módszerben alkalmazott zérus differenciális átfedés (ZDO) közelítésnek /15/. Ha ugyanis S_{ij} kicsi, ami esetünkben a kötéspályák térbeli elkülönülése miatt jó közelítéssel igaz, $T_{ij} \approx -S_{ij} \rightarrow \delta_{ij}$. A hiba kompenzálására az elhanyagolást az átfedési integrálban is alkalmazni kell, így

$$S_{ii} \rightarrow \sum_m c_{mi}^2 = 1 \quad (10)$$

A ZDO közelítés aránylag durva elhanyagolásokhoz vezet, ezek azonban szerencsés módon kompenzálják egymást /15/.

A (9) kifejezésben alkalmazott vegyértékpálya-közelítés, vagyis a törzselektronok és a magok figyelembevételre egyetlen effektív magtöltésszámmal egyre jobb, ahogy a potenciált a magtól egyre távo-

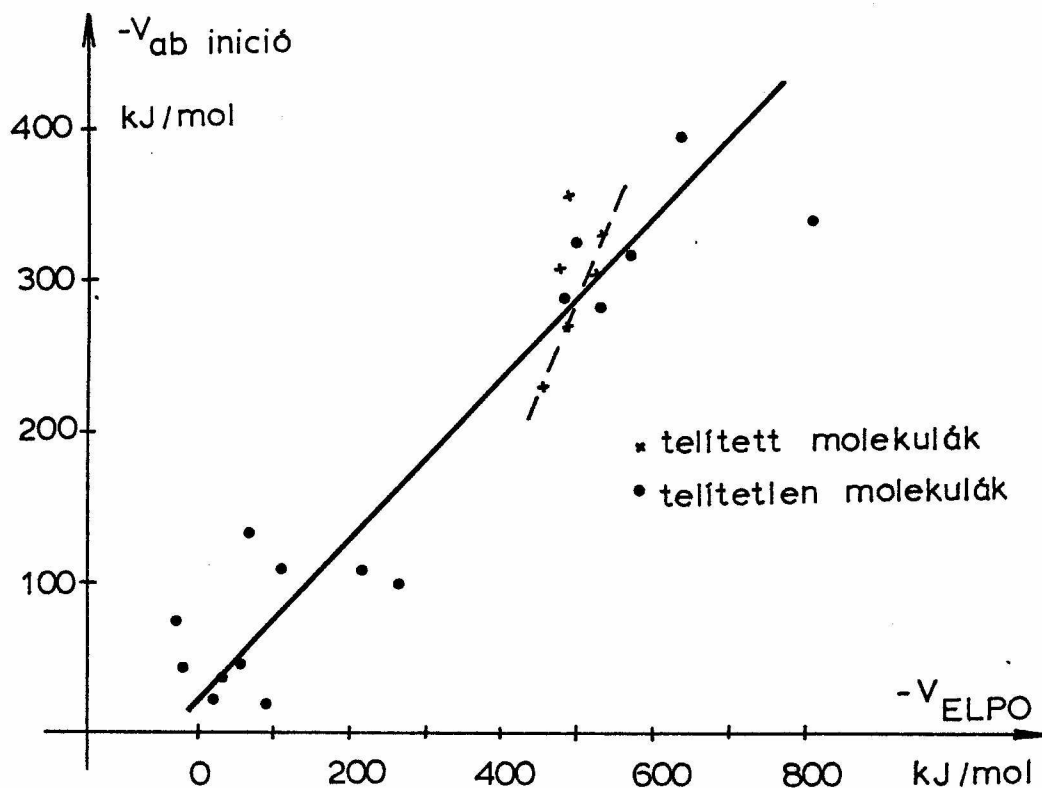
labbi térrészben tekintjük. A magvonzási integrálokban szereplő, a távolsággal exponenciálisan csökkenő tagok ugyanis eltűnnek, az elektrosztatikus potenciált egyedül a Coulomb-tag adja, erre pedig a közelítés pontosan teljesül. Mivel az $1s$ -pályák exponense igen nagy, a magtól 100 pm távolságban a törés potenciálja már igen jó közelítéssel Coulomb-szerű.

2.2. Összevetés más módszerekkel

Vizsgáljuk meg, hogy az előző fejezetben leírt közelítések együttes alkalmazásával kapott elektrosztatikus potenciál milyen megbízhatóan tükrözi a valóságos viszonyokat. Összehasonlítási alapul az ab inició módszerrel, minimális bázissal kapott számértékek szolgálnak. A II. táblázat tartalmazza a közelítő és a pontos adatokat néhány egyszerű molekulára. Az 1. ábrából látható, hogy a kétféle módon számított potenciál többé-kevésbé párhuzamosan változik.

A kötési járulékokból számított potenciál minimuma a MeNH_2 , Me_2NH , Me_3N és Me_2O molekulák körül igen jó korrelációban van az ab inició módszerrel számított értékekkel (1. ábra, II. táblázat). Távol esnek azonban a szaggatott vonallal huzott egyenes-től az ammóniának és a viznek megfelelő pontok. Minden bizonnyal ennek tudható be, hogy a közelítő mód-

szerrel kapott potenciáltérkép minimuma viz esetében a molekula síkjában van, míg az ab inició számításokból két minimumot kapunk a molekula síkja fölött és alatt, szimmetrikus elrendeződésben /3/.



1. ábra. ab inició és kötési járulékokból számított elektrosztatikus potenciálok minimumainak összefüggése néhány egyszerű molekula esetében (l. a II. táblázatot).

A kötési járulékok-közelítés egyik jelentős hiányossága az, hogy nem képes visszaadni az etilén és a benzol síkja fölött és alatt kialakuló, negatív potenciáltartományt. Kapunk ugyan egy-egy minimumot, de ennek értéke pozitív. Ebből arra a hibás követ-

II. táblázat. Az elektrosztatikus potenciál minimális értéke néhány egyszerű molekula körül (kJ/mol) /12/. Me = CH₃

molekula	ab inició min. bázis /5/	(9) egyenlet
NH ₃	-358	-490
MeNH ₂	-333	-532
Me ₂ NH	-305	-521
Me ₃ N	-275	-490
H ₂ O	-309 ^a	-480
Me ₂ O	-233	-456
etilén	- 75	+ 29
benzol	- 43	+ 20
fluorbenzol ^b	-100	-264
	- 46	- 54
piridin ^b	-286	-532
	- 21	- 88
pirrol ^b	- 38	- 29
	-109	-109
imidazol ^b	-397	-636
	-134	- 67
pirazol ^b	-341	-808
	-109	-218
adenin N1	-322 ^c	-569
N3	-328 ^c	-502
N7	-291 ^c	-486

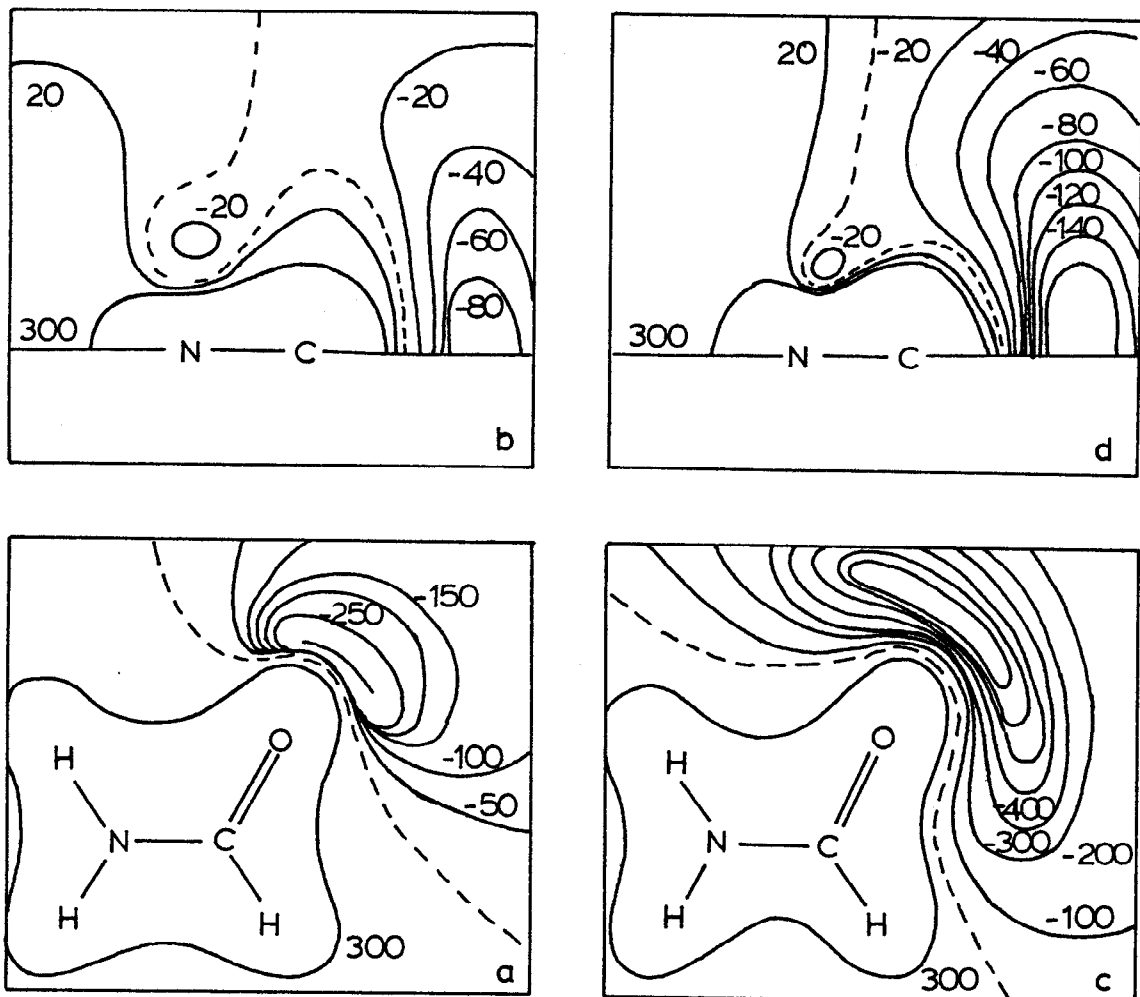
^a/3/ ^bfelső sor: a molekula síkjában, alsó sor:
170 pm távolságban a molekula síkja felett

^c/22/

keztetésre jutnánk, hogy például egy proton és az etilén vagy a benzol kölcsönhatása minden esetben taszító jellegű, ami nyilván nem igaz. A közelítő módszernek ez a fiaskója valószínűleg a differenciális átfedés elhanyagolásából ered. Ugyanis tág határok között változtatva a kötéspolaritásokat, a potenciál értéke pozitív marad: a hibás előjel tehát nem ezek helytelen megválasztásának következménye. Heteroaromás molekulák esetében több-kevesebb eltérés tapasztalható a regressziós egyenestől, kiugró a hiba a pirazol és a fluorbenzol esetében. Ugyancsak a közelítő módszer hiányosságaira utal az, hogy az adeninben rosszul adódik a minimumok sorrendje a nitrogénatomok körül (II. táblázat).

A felsorolt hiányosságok ellenére a potenciáltérkép legfontosabb vonásai reprodukálhatók a kötésjáru-lék-módszerrel (lásd például a formamidot a 2. ábrán).

Vizsgáljuk most meg, milyen megbízhatóan számítható ki két molekula kölcsönhatási energiája az (1) egyenletből. Hibát okozhat a V_A potenciál és az atomi töltések pontatlansága. Mivel az utóbbiak nem is mérhető mennyiségek, csak több-kevesebb önkényességgel definiálhatók. Amint a reagáló molekulák közelebb kerülnek egymáshoz, egyre nagyobb szerepet ját-



2. ábra. A formamid elektrosztatikus potenciáltérképe a molekula síkjában (alul) és arra merőlegesen az N-C kötést tartalmazó síkban (felül). Bal oldalon az ab inició /3/, jobb oldalon a kötészárulék-közéltetéssel kapott térképek láthatók. A szintvonalakhoz irt számok kJ/mol-ban értendők.

szik a kicserélődés, a töltésátmenet és a molekulák kölcsönös polarizációja /23/, melyet elhanyagoltunk. Ennek ellenére, például a viz-formamid komplex kon-

formációs energiaváltozásai igen pontosan meghatározhatók (1) alapján, feltéve, hogy nemcsak az atommagok helyén, hanem körülöttük is elhelyezünk megfelelő nagyságu ponttöltéseket /3/. Ha csak atomi ponttöltések rendszerével modellezzük a B molekulát, nem vesszük figyelembe az atomi dipólusok és további multipólusok kölcsönhatását az A molekula elektrosztatikus terével. Szerencsére az (1) egyenletben elhanyagolt tagok, valamint a V_A potenciál közelítő számításából eredő hibák előjele ellentétes. A $H_3N...HF$ hidrogénhiddal kapcsolódó rendszer és 6 vízmolekulából álló hidrátburka közötti kölcsönhatási energiára CNDO/2 módszerrel számítva -89 kJ/mol, míg az (1) képletből, az ELPO programmal számított potenciállal és CNDO/2 töltésekkel -116 kJ/mol adódik. A megfelelő értékek a $H_3NH^+...F^-$ ionpár esetében -487 kJ/mol és -320 kJ/mol /24/. A közelítő számításból tehát tükröződik a lényeges különbség a semleges forma és az ionpár hidratációs energiája között.

Igen nagy molekulák elektrosztatikus potenciáltérképének közelítő meghatározására többen használják a ponttöltés-modellt is /25/. A CNDO/2 vagy ab initio módszerrel meghatározott hullámfüggvényből kapott nettó atomi töltések együttese határozza meg a potenciált, melyet igen gyorsan és gyakorlatilag

tetszés szerinti nagy rendszerre kiszámíthatunk. Ez a módszer a kötésjárulék-közelítéshez viszonyítva jelentős elhanyagolásokat tartalmaz. Minthogy a molekulát kizárólag monopólusok együttesével modellezi, zérusnak tekinti az egyes atomoktól számított r_i távolság második és magasabb hatványaival fordítottan arányos tagokat, melyek fontosak lehetnek. Például egy $-0,3$ elektronnyi töltést hordozó oxigén-atomtól 200 pm távolságban az r^{-2} -től függő járulék -55 kJ/mol. A fenti elhanyagolás következtében a ponttöltés-modell helytelenül adja vissza a magányos pároktól származó potenciál anizotrópiáját is.

A III. táblázatban összehasonlítjuk a kétféle közelítést. A szubtilizinre a PROTPOT programmal

III. táblázat. Az elektrosztatikus potenciál (kJ/mol) a szubtilizin katalitikus triádja mentén különböző közelítésekben

közelítés	Ser-221 O^{γ}	His-64 $N^{\epsilon 2}$	$N^{\delta 1}$	Asp-32 F^a
ponttöltés ^b	-126	-207	-249	-270
ponttöltés PROTPOT ^c	-171	-252	-270	-256
kötési járulék PROTPOT ^c	- 66	-160	-163	-137

^a $O^{\delta 1} \dots O^{\delta 2}$ szakasz felezőpontja

^b Kollman és Hayes szerint /27/

^c Ángyán és Náray-Szabó szerint /26/

/19/ végzett számítások során figyelmen kívül hagytuk a (9) egyenletben szereplő, n magasabb hatványaitól függő tagokat. Ezáltal a Hayes--Kollman-modell megfelelőjéhez jutunk és meg tudjuk becsülni az elhanyagolások nagyságát. A kétféle ponttöltés-modell hasonló eredményeket ad a szubtilizin Ser-His-Asp katalitikus triádjának néhány pontjában számított potenciálra. Jelentős azonban az eltérés akkor, ha a kötési járulékokat a (9) egyenletben megadott integrálok pontos kiszámításával becsüljük. A változás iránya, legalábbis a bemutatott példa esetében hasonló mindhárom modellnél. A ponttöltés-modell ebben az esetben tehát használható, ha a térbeli változást akarjuk leírni. Erre van szükség például a szerin-proteázok aktiv centrumában lévő $\text{His}^+ - \text{Asp}^-$ ionpár környezettől származó energiájának becslésénél. Hibás eredményt kapunk azonban akkor, ha egy monopólus, például egy proton elektrosztatikus kötési energiájára vagyunk kíváncsiak. Mivel a kötésjárulékok-modell alapján írt ELPO és PROTPOT programok nem igényelnek sok számítógép-időt, véleményem szerint a ponttöltés-közelítés használata csak különösen nagy volumenű számítások esetében indokolt.

Az értékelést összefoglalva, az általam javasolt módszer elsősorban igen nagy rendszerek, mint példá-

ul fehérjék tárgyalására alkalmas. Segítségével durván megbecsülhető a környezet hatása kémiai reakciók egyensúlyára és sebességére. Sikeres lehet kisebb molekulák esetében is töltéskontrollált reakciók térbeli vonatkozásainak vizsgálatánál. Néhány példát a 3. és a 4. fejezetben mutatok majd be. Kis molekulák elektrosztatikus potenciálját általában célszerűbb az inició módszerrel meghatározni. Ha ez nem valósítható meg, a kötésjárulék-módszer is használható, de megfelelő óvatossággal, lehetőleg más számításokkal vagy kísérleti adatokkal kiegészítve (lásd a 3.3. alfejezetet).

2.3. Általánosítás nukleofil reakciókra

Az elektrosztatikus potenciál eredeti alakjában legfeljebb közvetve alkalmas nukleofil reakciók tárgyalására. Ha gépiesen elfogadjuk, hogy negatív töltésű nukleofil ágens csak a potenciál pozitív tartományainak megfelelő irányokból támadhat, a reagáló rendszer összeomlik, mert a magok közelében a potenciál mindig nagy, határesetben végtelen érték. $r = R_m$ esetében ugyanis a (9) egyenlet első tagja véges, míg a második tag végtelen. A hibát az okozza, hogy az (1) képletben elhanyagoltuk a reagáló molekulák atomtörzseinek kölcsönhatását, mely mindig taszító

jellegű és a magtávolság növekedésével exponenciálisan növekszik. Emiatt a nukleofil ágens esetében is taszítás jön létre, ha a két reagáló rendszer elég közel kerül egymáshoz.

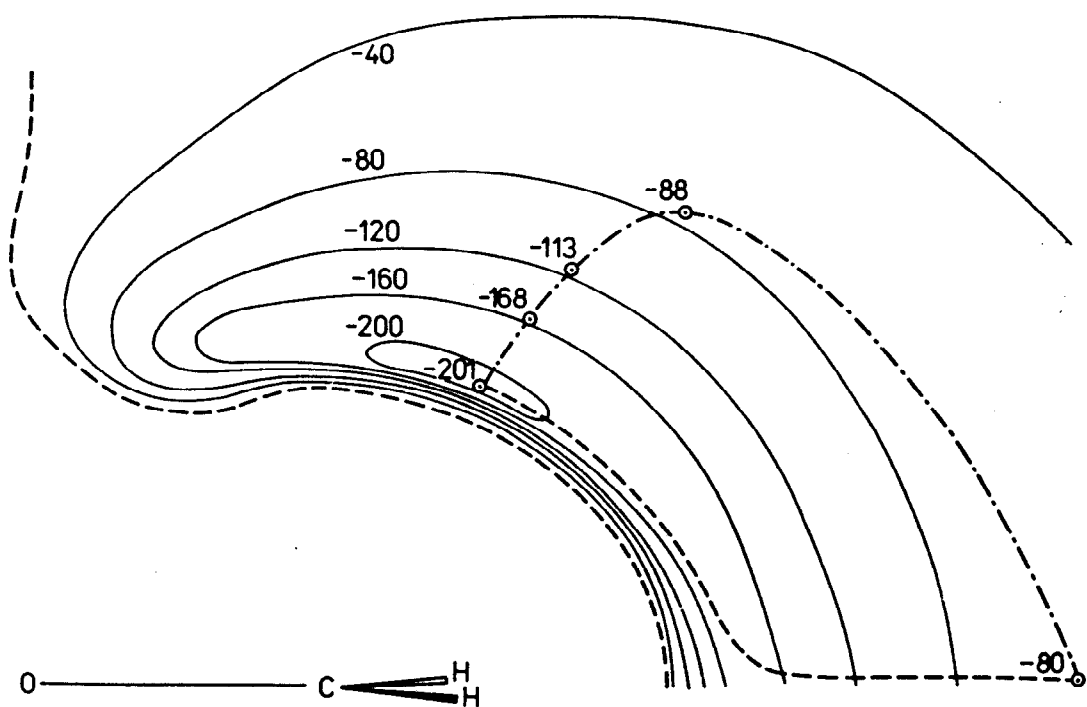
A törzsek kölcsönhatását - heurisztikus módon - egyszerű, 6-12 típusú kifejezéssel vehetjük figyelembe /28/. Az (1) egyenlet pontszerű elektrofil vagy nukleofil ágens támadásának leírására a következőképpen általánosítható:

$$E_{AB} = q_B V_A(r_B) + \sum_m (-B_{Bm} r_{Bm}^{-6} + C_{Bm} r_{Bm}^{-12}) \quad (11)$$

A (10) egyenletben $q_B = \pm 1$ aszerint, hogy a B ágens elektrofil vagy nukleofil. $V_A(r_B)$ az A molekulától származó, kötési járulékokból számított elektrosztatikus potenciál a támadó ágens helyén, r_{Bm} ennek távolsága az A molekula m -edik atomjától. B_{Bm} és C_{Bm} tapasztalati állandók, melyek értékét úgy választottam meg, hogy a $H^- + H_2CO$ reakció ab inició módszerrel meghatározott energiafelületét /29/ a lehető legjobban reprodukálhassam. Aszerint, hogy m H- vagy C-, N-, O-, illetve F-atomot jelöl, B_{Bm} és C_{Bm} értéke különböző:

$$\begin{aligned} B_{BH} &= 1,7 \times 10^{-4} \text{ kJ nm}^6/\text{mol} \\ C_{BH} &= 1,3 \times 10^{-9} \text{ kJ nm}^{12}/\text{mol} \\ B_{BX} &= 5,2 \times 10^{-4} \text{ kJ nm}^6/\text{mol} \\ C_{BX} &= 6,3 \times 10^{-9} \text{ kJ nm}^{12}/\text{mol} \end{aligned} \quad (12)$$

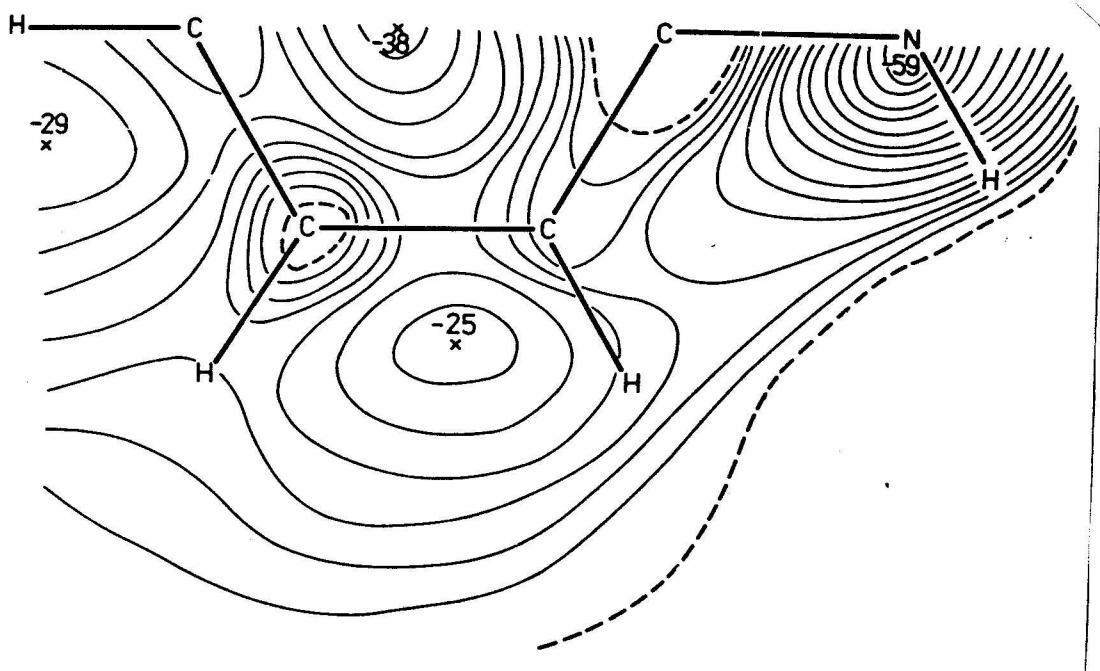
A 3. ábrán látható, hogy a (12) egyenlet állandóival kvalitatíve reprodukálható az illesztéshez használt energiafelület. A (12) egyenlet konstansáival kapott elektrofil potenciáltérképnek az etilén és benzol síkja alatt és fölött negatív tartománya van, a minimum -25, illetve -20 kJ/mol. Homoaromás rendszerek protonálódása tehát kvalitatíve követhető a (11)



3. ábra. Formaldehid nukleofil potenciáltérképe a molekula síkjára merőleges, a HCH szöget felező síkban (kJ/mol). Pont-vonás és a bekarikázott pontok mellé irt számok jelölik a $\text{H}_2\text{CO} + \text{H}^-$ rendszer ab inició számítással kapott relatív energiáját az adott helyen. A szaggatott vonal a potenciáltérképnek megfelelő, minimális energiájú pályát mutatja.

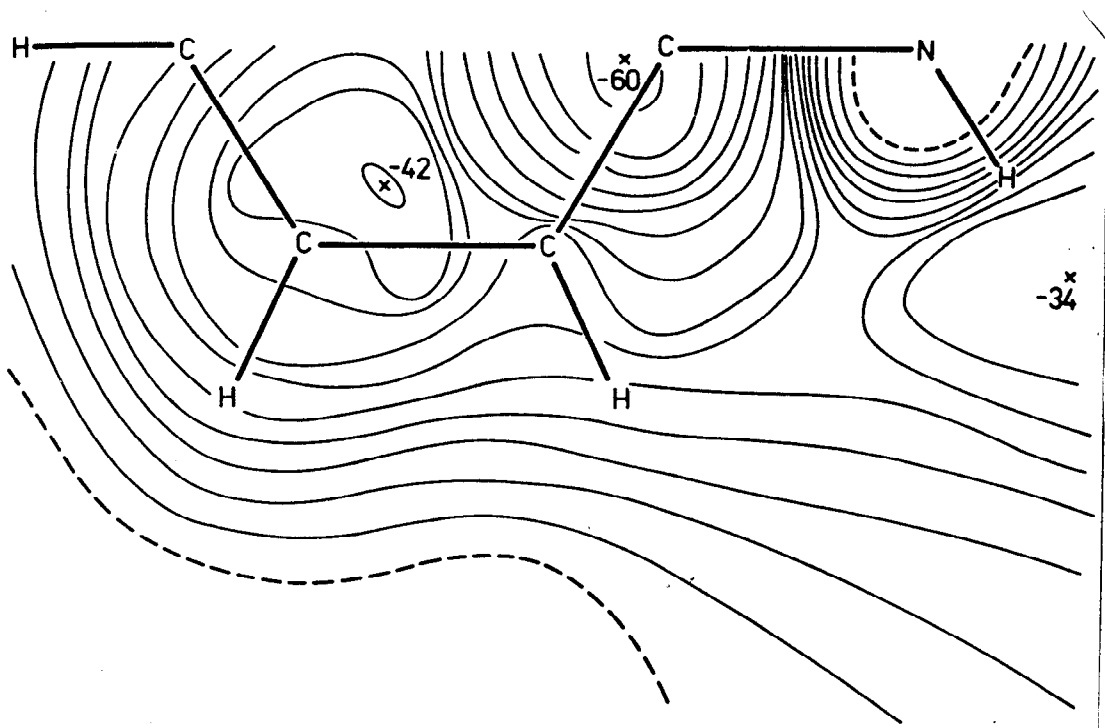
egyenlettel. Ezzel kiküszöbölődik a kötésjárulék-
-módszerrel számított elektrosztatikus potenciál
legszembevetőbb hibája.

A bemutatott modell teljesítőkéességét az ani-
lin példáján mutatjuk be. Az elektrofil potenciál-
térképen (4. ábra) a szubsztituenshez képest *meta*-
helyzetű szénatom környezetében taszító tartomány
alakul ki, a reakció az irányítási szabályoknak meg-
felelően *orto*- és *para*-helyzetben kedvezményezett.



4. ábra. Elektrofil potenciáltérkép az anilin sikkal párhuzamos, attól 150 pm-re lévő síkban. A vonalak $-4, -8, -12, \dots$ kJ/mol-nak felelnek meg, a helyi minimumokat kereszt jelöli.

A minimumok mélyebbek, mint a benzolnál (-20 kJ/mol), tehát a térképből tükröződik az az ismert tény, hogy az anilin könnyebben szubsztituálható elektrofil ágenssel, mint a benzol. A nukleofil térképen (5. ábra) látható, hogy a *meta*-szénatom kedvezményezett, de a reakció a benzolhoz képest gátolt. Ennek a nukleofil potenciáltérképén a minimum ugyanis -59 kJ/mol, mélyebb, mint az anilin *meta*-szénatomjához közel eső minimum értéke.



5. ábra. Ugyanaz, mint a 4. ábrán, nukleofil támasra.

3. Kémiai alkalmazások

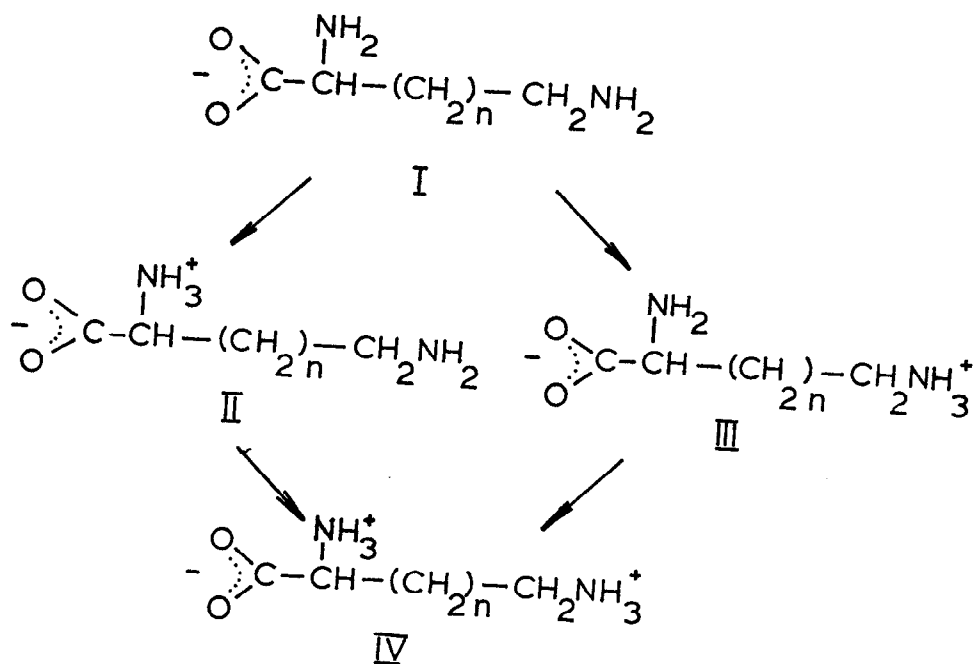
Ebben a fejezetben néhány példát mutatok be arra, hogyan alkalmazható a kötésjárulék-módszerrel számított elektrosztatikus potenciál bizonyos kémiai jelenségek értelmezésére. Bár a vizsgált molekulákra ab inició számítások is végezhetőek, ezek igen költségesek lennének. Talán fontosabb érv azonban a közelítő módszer alkalmazása mellett az, hogy a kötési járulékok átvihetősége folytán lehetővé válik általánosabb, más rendszerekre további számítások nélkül is átvihető szabályszerűségek felismerése. Ezt illusztrálja a 3.1. és a 3.2. alfejezet, melyek az elektrosztatikus téreffektus két sajátos megnyilvánulásával foglalkoznak.

3.1. Elektrosztatikus téreffektus α, ω -diaminokarbonsavak protonálódásánál

A szubsztituensek téreffektusa induktív és direkt elektrosztatikus járulékokra bontható /30/. Az első a kötések polarizációja révén alakul ki és három-négy szigma kötésnél távolabb hatása már nem érvényesül. A közvetlenül téren át ható járulék akkor fontos, ha a molekulában töltött csoport van, melynek az elektrosztatikus tere igen távoli térszékben is számottevő. A kétféle hatás megkülönböz-

tetése kísérleti alapon igen nehéz, ezért általában együtt szokták őket tárgyalni, egyszerűen "induktív" vagy "tér (field)"-effektus megjelöléssel. A járulékok azonosítása kvantumkémiai módszerekkel végezhető el /31-33/. A probléma tárgyalására - véleményem szerint - különösen alkalmas a kötészárulék-közelítéssel számított elektrosztatikus potenciál, mivel ebben a kötések átvihetősége folytán az induktív effektust figyelmen kívül hagyjuk.

Az elektrosztatikus téreffektust az α, ω -diaminokarbonsavak 6. ábrán összefoglalt protonálódási egyensúlyai esetében vizsgáltuk /34/. Az egyensúlyok



6. ábra. α, ω -diaminokarbonsavak protonálódási egyensúlyai ($n = 0, 1, 2, 3$)

különböző ionos és ikerionos formák között jönnek létre és a töltött szubsztituensek távol esnek a protonálódás helyétől. A modellen tehát jól tanulmányozható a jelenség természete.

A CNDO/2 módszer /15/ erő-változatával /35/ optimalizáltuk a vizsgált molekulák (2,3-diaminopropionsav, 2,4-diamino-vajsav, ornitin és lizin), valamint protonált és deprotonált származékaik geometriáját. Az energiakülönbségekből a gázfázisú protonálódási energiát kapjuk (IV. táblázat). Bár a CNDO/2 módszer alkalmatlan egyes molekulák protonálódási energiájának számszerű meghatározására, a változások irányzata jól követhető. A 7. ábrán látható néhány fontosabb molekula gázfázisban mért és általunk számított protonálódási energiájának az összefüggése. A jó korreláció alapján állíthatjuk, hogy a szemiempirikus módszer alapján talált törvényszerűségek nem lehetnek műtermékek, érvényesek a kísérleti adatokra is.

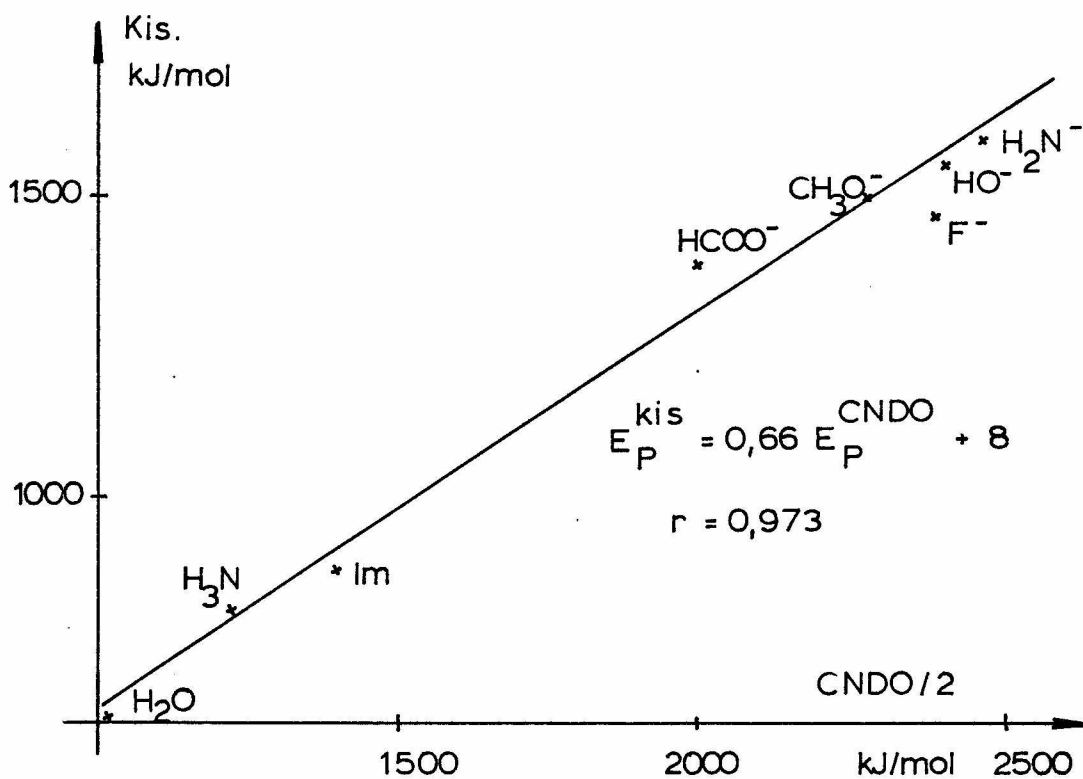
A számított protonálódási energiák jó korrelációban vannak a (9) egyenletből számítható potenciál adott atom körül felvett minimális értékével:

$$E_p^{\text{CNDO}} = -1,32V_{\min} + 747 \text{ (kJ/mol)} \quad r = 0,932 \quad (13)$$

IV. táblázat. A 6. ábrán látható α, ω -diaminokarbon-savak protonálódási energiái, potenciálminimumai (kJ/mol), és nettó töltése a N-atomokon (milli-elektron). A (14) egyenlettel becsült protonálódási energiák zárójelben láthatók.

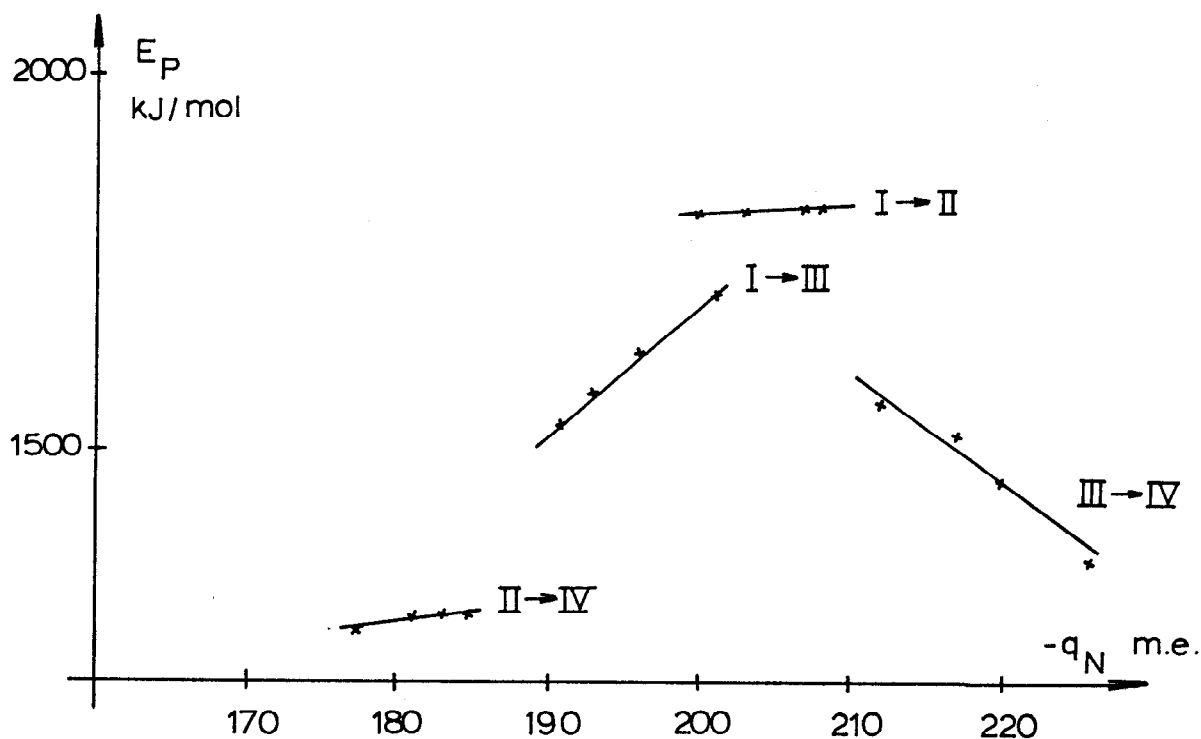
$n =$	0	1	2	3
$E_P(I \rightarrow II)$	1824 (1781)	1831 (1781)	1826 (1781)	1824 (1781)
$-V_\alpha(I)$	777	809	803	816
$-q_\alpha(I)$	203	208	207	200
$E_P(I \rightarrow III)$	1712 (1758)	1637 (1661)	1584 (1595)	1541 (1548)
$-V_\omega(I)$	736	699	690	666
$-q_\omega(I)$	201	196	193	191
$E_P(II \rightarrow IV)$	1250 (1287)	1284 (1335)	1285 (1315)	1288 (1328)
$-V_\omega(II)$	385	423	470	470
$-q_\omega(II)$	177	183	181	184
$E_P(III \rightarrow IV)$	1362 (1310)	1467 (1455)	1527 (1501)	1571 (1561)
$-V_\alpha(III)$	381	510	555	612
$-q_\alpha(III)$	226	220	217	212

Mivel a potenciál járulékait tökéletesen átvihetőnek tekintjük, a fenti összefüggés azt fejezi ki, hogy a protonálódási energia változásának oka az elektrosztatikus téreffektus változása. A IV. táblázatból látható, hogy kismértékben a protonálódó



7. ábra. A CNDO/2 módszerrel számított és a gázfázisban mért /36, 37/ protonálódási energiák összefüggése

nitrogénatomok töltése is változik a lánchosszal, tehát az induktív effektus is játszhat bizonyos szerepet. A 8. ábra szerint azonban nincs összefüggés a töltés és E_p között, ha mind a négy protonálódási egyensúlyt tekintjük. Ha a 6. ábra III \rightarrow IV egyensúlyát külön vesszük, az atomi töltések változása elég jól követi a protonálódási energiák változását. A 8. ábrán látható, hogy az összes töltésváltozás csak 40 kJ/mol potenciálváltozásnak felel meg a proton helyén (a protonálódó atomtól 100 pm távolságban).



8. ábra. A gázfázisú protonálódási energiák összefüggése a protonakceptor nitrogénatom q_N nettó töltésével.

Ez csak a tizedrésze a töltött csoportoktól származó elektrosztatikus téreffektusnak. A protonálódási energiák változását tehát döntő részben a töltött szubsztituensek téren át terjedő hatása okozza.

A karboxilát és ammónium szubsztituensek elektrosztatikus tere nagy távolságban jó közelítéssel Coulomb-szerű. Ennek alapján a (13) egyenlet egyszerűsíthető:

$$E_p^{\text{CNDO}} = E_p^{\text{metilamin}} + 236r_{\text{CO}_2}^{-1} - 145r_{\text{NH}_3}^{-1} \quad (14)$$

(kJ/mol). Itt $E_p^{\text{metilamin}}$ a referenciaként szolgáló metilamin protonálódási energiája (1281 kJ/mol), r_{CO_2} , illetve r_{NH_3} a távolság a nitrogénatomok körül kialakuló potenciál minimumának helye és a karboxilát két oxigénatomja által kijelölt szakasz O_b felezőpontja, illetőleg az ammóniumcsoport nitrogénatomja között. A IV. táblázatban zárójelben tüntettem föl a (14) egyenlettel becsült gázfázisú protonálódási energiákat, az eltérés ± 50 kJ/mol. Kihasználva a CNDO/2 módszerrel számított és gázfázisban mért értékek közötti lineáris összefüggést (7. ábra), a (14) egyenlet általánosítható. Ha az induktív és rezonancia-effektustól eltekinthetünk, tehát a protonálódás helyét legalább három szigma kötés választja el a töltött szubsztituenstől, a következő összefüggés írható fel:

$$E_p^{\text{szubszt}} = E_p^{\text{nemszubszt}} + 156r_{\text{CO}_2}^{-1} - 95,7r_{\text{NH}_3}^{-1} \quad (15)$$

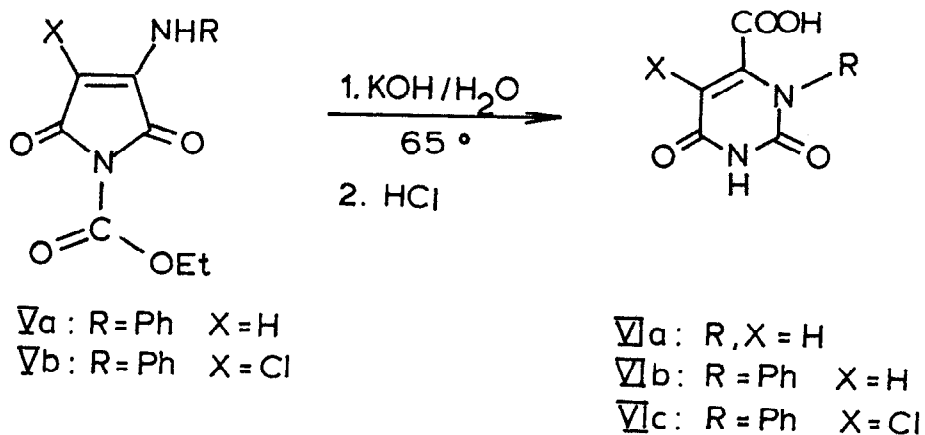
A (15) egyenlet alkalmas a kísérleti adatok méréseket megelőző vagy azokat kiegészítő becsülésére.

Fontos megjegyezni, hogy a fenti megállapítások csak a gázfázisra érvényesek. Sayer és Rabenstein /38/ megmérték a 6. ábrán feltüntetett egyensúlyoknak megfelelő pK értékeket vizes oldatban. Ezek va-

lamennyi sorozat esetében monoton nőnek a lánchoszszal, nem állapítható meg korreláció köztük és az elektrosztatikus potenciál minimális értéke között. Ennek valószínű oka a hidratáció, mely eltérő mértékben stabilizálja a különböző protonált formákat. A pK értékét minden bizonnyal elsősorban befolyásoló tényező a hidratációs energia, ennek változása pedig elfedi a szubsztituenshatást.

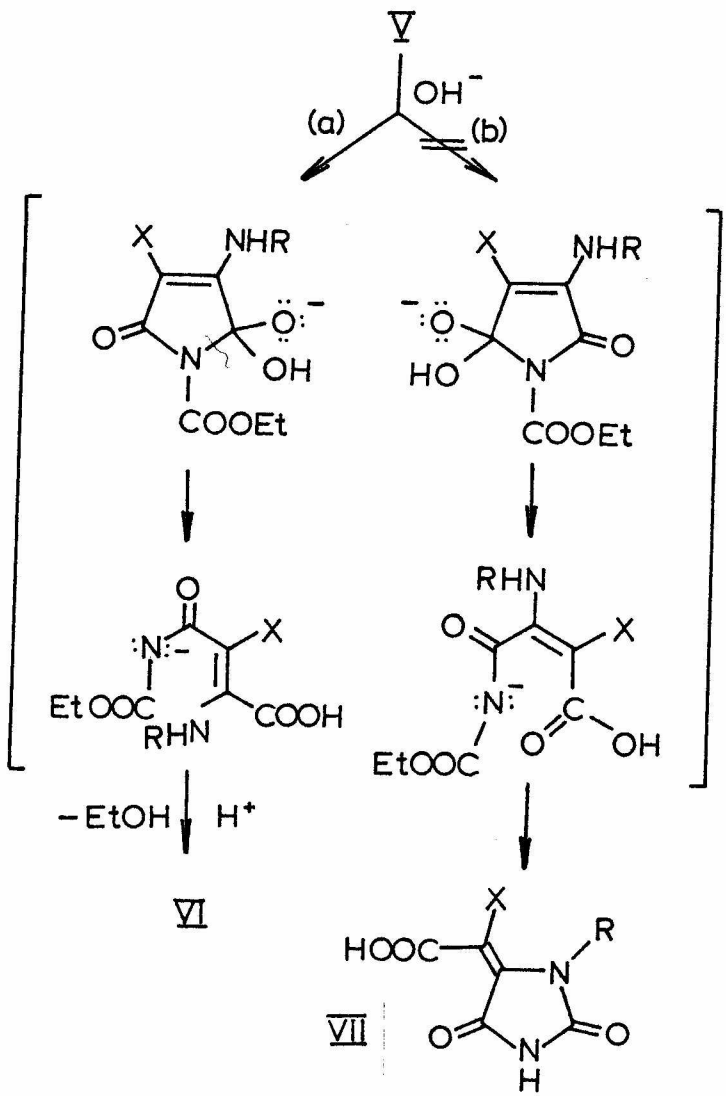
3.2. Elektrosztatikus téreffektus 1,3,4-triszubsztituált maleinimidek gyűrűfelnyílásánál

1-Karboxi-3,4-diszubsztituált maleinimid-származékokat lugban melegítve, majd a reakcióelegyet megsavanyítva orotsav-származékokhoz jutunk (9. ábra) /39/. A kiindulási és végtermékek szerkezete röntgendiffrakciós vizsgálatokkal azonosítható.



9. ábra. 1,3,4-Triszubsztituált maleinimidek gyűrűtranszformációja.

A gyűrűtranszformáció mechanizmusa a következő /39/. A hidroxilion, mint nukleofil ágens a maleinimid-gyűrű 2-es szénatomján támad. A tetraéderes intermedier képződése után a gyűrű felnyílik, majd konformációs átalakulás következik be és etanol kilépése után orotsav-származék keletkezik (10. ábra).



10. ábra. A gyűrűfelnyílás mechanizmusa (sematikus). (a) támadás a 2-es szénatomon, (b) hipotetikus támadás az 5-ös szénatomon.

A reakció során nem mutatható ki hidantoin származék (VII), ebből arra lehet következtetni, hogy a hidroxilion támadása az 5-ös szénatomon gátolt.

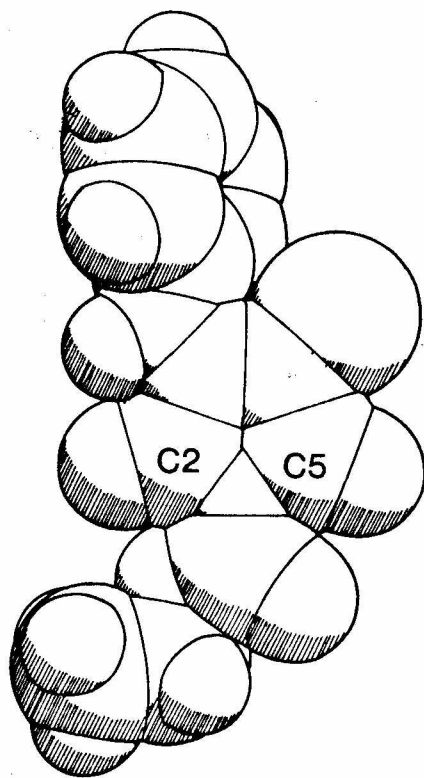
Felmerül a kérdés, hogy mivel magyarázható a régióspecifitás, miért kizárólag a 2-es szénatom támadása kedvezményezett. A reakció irányát három tényező befolyásolja:

- a C2- és C5-atomok nettó töltése;
- a 3-as szubsztituens térbeli gátlása;
- elektrosztatikus téreffektus.

A Klopman-elmélet /2/ szerint a hidroxilion támadása töltéskontrollált, tehát azon az atomon megy végbe nagyobb valószínűséggel, melynek pozitívabb a nettó töltése. CNDO/2 számítások szerint az V vegyület modelljének tekinthető, hipotetikus 1-karboxi-3-vinilamino-maleinimidben a C2 és a C5 szénatomok töltése 323, illetve 364 millielektron. A töltéskontroll alapján tehát a támadás a C5-atomon lenne kedvezményezett.

Kvantumkémiai számítások /29/, valamint röntgen-diffrakciós mérési adatok elemzése alapján /40/ kimutatható, hogy a karbonilcsoport és nukleofil ágens reakciójának kezdeti lépése a hátoldali támadás (rearside attack). Másszóval, a hidroxilion a karbonilcsoportot annak oxigénnel ellentétes oldala felől közelíti (3. ábra). Elképzelhető lenne tehát,

hogy esetünkben a 3-as helyzetű szubsztituens térbeli gátlása folytán nem jöhet létre reakció az 5-ös szénatomon. Ez az eset valósul meg az V vegyülettel rokon, 3-as helyzetben két nagy térigényű szubsztituenst tartalmazó szukcinimid-származékok reakciójánál hidrogén-anionnal /41/: a támadás kizárólag a 2-es szénatomon megy végbe.



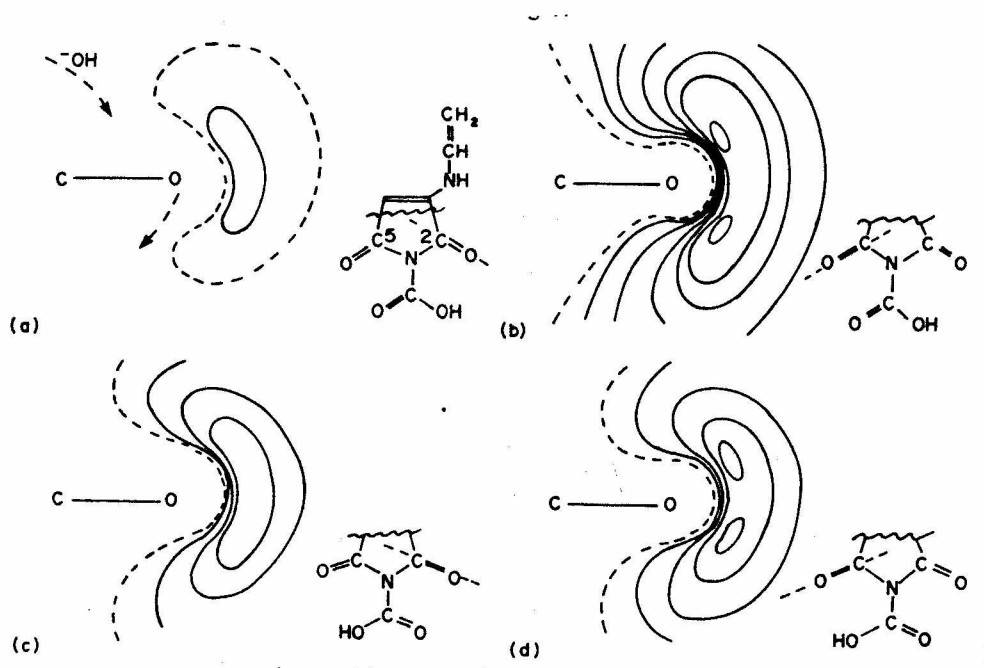
11. ábra. 1-Etoxikarbonil-3-fenilamino-4-klór-maleinimid térmodellje

A 11. ábrán az Vb vegyület térmodelljéből azonban jól látszik, hogy a telített gyűrűhöz kapcsolódó

fenilamino-csoport nem áll ki jelentősen a síkból, ezért a térgátlása minden bizonnyal jelentéktelen, nem magyarázza a régióspecifitást.

A C2-atom kedvezményezett szerepét minden valószínűség szerint az 1-es nitrogénhez csatlakozó etoxikarbonil-csoport elektrosztatikus téreffektusa okozza. Röntgendiffrakciós mérések szerint kristályos fázisban a 12. ábrán (a)-val és (b)-vel jelölt konformáció valósul meg. Az etoxikarbonil-csoport elektrosztatikus tere jelentősen megnöveli a negatív tartományt a C50-kötés környezetében, ezért a negatív töltésű nukleofil ágens támadása gátolt. A magyarázat akkor is érvényes, ha oldatban nem a kristályos fázisnak megfelelő konformáció valósul meg. Az etoxikarbonil-csoport kiforgása a síkból a konjugáció megszűnése miatt energetikailag kedvezőtlen, ezért az egyetlen lehetséges alternatíva a 12 (c-d) ábrákon feltüntetett planáris térállás. CNDO/2 számítások szerint gázfázisban a kétféle konformernek megfelelő energia közel azonos, igen kicsi mértékben, 6 kJ/mol-lal a (c-d) konformáció stabilisabb. Ennél a konformációnál is negatívabb a potenciál a C50 kötés környezetében, a hidroxilion támadása tehát ebben az esetben is gátolt a C5-atomon. Igen valószínű, hogy vizes oldatban a két kon-

former folyamatosan átalakul egymásba, azonban ettől függetlenül a reakció minden esetben a 2-es szénatomon játszódik le.

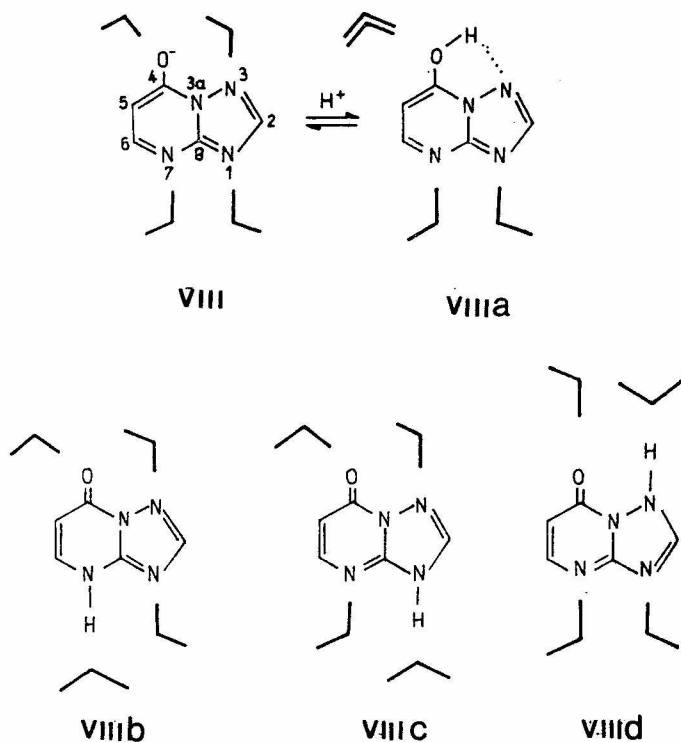


12. ábra. Elektrosztatikus potenciál a hipotetikus 1-karboxi-3-vinilamino-maleinimid karbonil-oxigén-atomjainak környezetében. A szaggatott vonal mentén a potenciál zérus, a kihuzott vonalak a legkülsőtől a legbelsőig rendre -400, -800, -1200, -1600, -2000 és -2500 kJ/mol-nak felelnek meg. A hidroxilát-anion sematikus reakcióútja az (a) részben látható.

3.3. Egyéb alkalmazások

A 2.2. alfejezetben bemutatott adatok szerint a kötésjárulék-módszer jelentős mértékben tulbecsüli az elektrosztatikus potenciál értékét. Az adenin esetében még a nitrogénatomok körül kialakuló minimumok sorrendje is hibásan adódott az ab inició módszerrel, minimális bázissal számított értékekhez képest. Ha azonban megfelelő óvatossággal járunk el, hasznos információkat szerezhethetünk ennek a durvább, de lényegesen olcsóbb módszernek segítségével is. Erre példa a 4-hidroxi-6-metil-1,3,3a,7-tetrazaindén, a fényképészetben alkalmazott, fontos stabilizálószer tautomerizációs viszonyainak vizsgálata /42/.

A vegyület modelljeként vizsgált molekula anionját és a négy lehetséges tautomert a 13. ábra mutatja. Első lépésben kiszámítottuk a bemutatott szerkezetek összes energiáját a CNDO/2 közelítésben. Valamennyi modell geometriáját optimalizáltuk az erőmódszer segítségével /35/. Második lépésben figyelembe vettük a hidrátburok hatását, melyet a 13. ábrán feltüntetett négy vízmolekula együttesével modelleztünk. A hidratációs energiát az (1) egyenletből becsültük, a V_A potenciál itt a vízmolekulától származik és a hidratált molekula atomi töltéseit a CNDO/2 módszerrel kaptuk. A számszerű ered-



13. ábra. A 4-hidroxi-1,3,3a,7-tetrazaindén anionja és lehetséges tautomerjei. Az első hidrátburkot V-alaku vízmolekulák jelképezik, melyek az ábra szerinti elrendeződésben veszik körül az oldott anyagot.

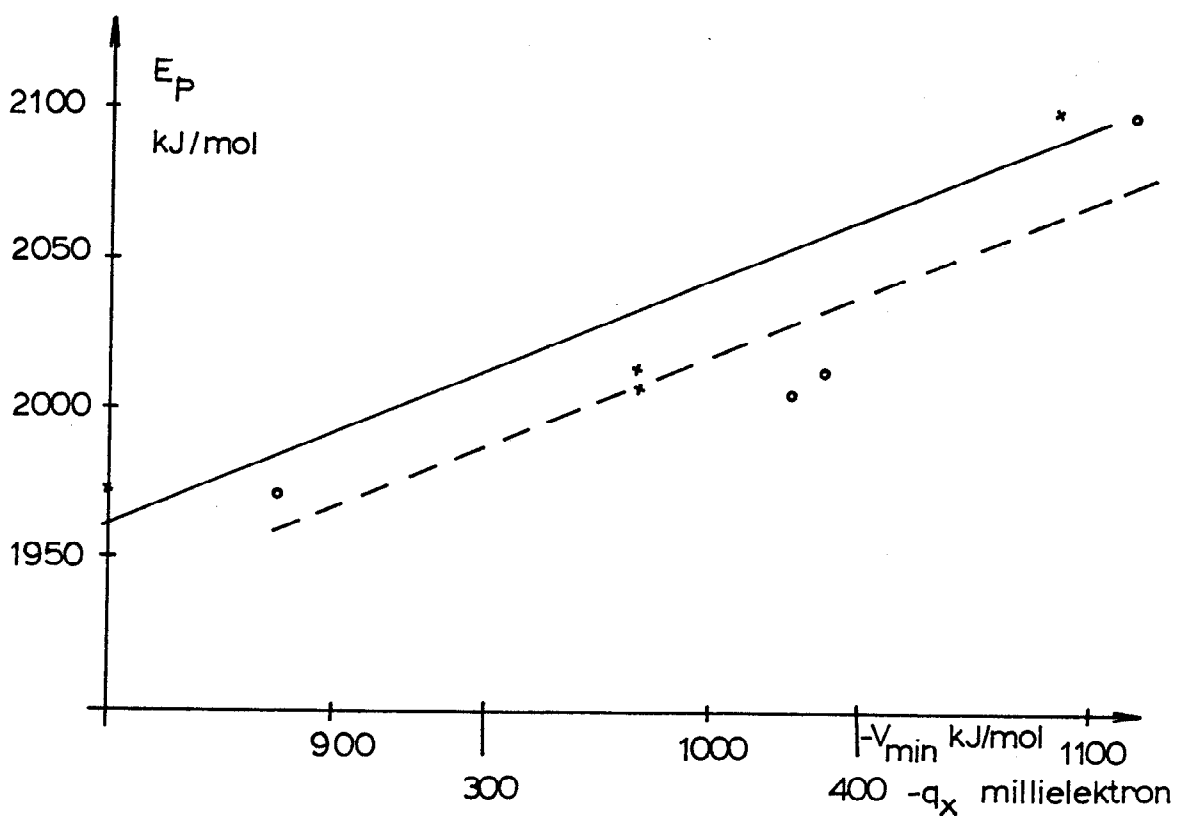
mények az V. táblázatban láthatók. Ebből kitűnik, hogy a protonálódási energia gáz- és vizes fázisban, valamint az atomi töltések, illetve a kötészárulék-módszerrel számított potenciál minimális értéke párhuzamosan változnak. Az összefüggés jó közelítéssel lineáris (14. ábra):

$$E_p = -0,4931V_{min} + 1544 \quad r = 0,878 \quad (16)$$

$$E_p = -0,5240q_N + 1829 \quad r = 0,829 \quad (17)$$

V. táblázat. Nettó atomi töltések (millielektron), elektrosztatikus potenciálok és protonálódási energiák (kJ/mol) a 4-oxo-1,3,3a,7-tetrazaindenil-anion esetében

atom	N3	N1	N7	O
töltés, q_{N_i}	-245	-381	-390	-472
potenciál, V_{min}	-840	-982	-982	-1091
E_p (gáz)	-1972	-2008	-2016	-2100
E_p (viz)	-1949	-1975	-1986	-2058



14. ábra. A CNDO/2 módszerrel számított protonálódási energia és az elektrosztatikus potenciál, illetve a nettó atomi töltés összefüggése a VIII a-d tautomereknél.

A (16-17) egyenletekből az is megállapítható, hogy a $V_{min} - E_p$ összefüggés korrelációs együtthatója nagyobb, mint a $V_{min} - q_N$ kapcsolaté, a standard hiba 16,4 illetve 19,4 kJ/mol, tehát az elektrosztatikus potenciál közelítő értékéből pontosabban megbecsülhetjük a protonálódási energiát, mint az atomi töltésből. Ez is alátámasztja a 2.2 alfejezetben olvasható érvelést, miszerint az elektrosztatikus potenciál számítására a ponttöltés-modell /25/ kevésbé alkalmas, mint a kötésjárulék-módszer.

A 7. ábra szerint a gázfázisban mért és a CNDO/2 módszerrel számított protonálódási energiák jó közelítéssel párhuzamosan változnak. Ebből arra lehetne következtetni, hogy a jelen esetben is a valósághoz hűen reprodukáltuk a nagyságviszonyokat. A regressziós egyenlet standard hibája azonban 65 kJ/mol, míg az V. táblázat adatai szerint a tautomérek protonálódási energiája közötti maximális különbség mindössze 128 kJ/mol. Elképzelhető tehát, hogy esetünkben a CNDO/2 számítások rossz sorrendet adnak és túlbecsülik az O-protonált forma stabilitását. Több szerző szerint ugyanis oldatban és szilárd fázisban az N7-protonált, keto-forma van jelen /43-44/.

Az elektrosztatikus potenciáltérkép segítségével tanulmányoztuk az Ag^+ -ion kötődését a 4-oxo-

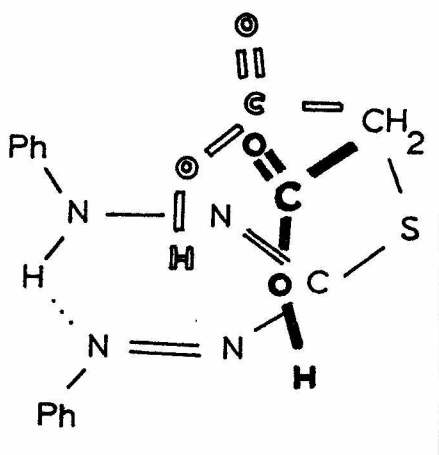
-1,3,3a,7-tetrazaindenil anionhoz. Röntgendiffrakciós mérések szerint /45/ kristályos fázisban egy ezüstion két molekulát kapcsol össze úgy, hogy kötést létesít a magányos párt hordozó atomokkal. Az AgX (X = N1, N7, N3 és O) kötések hossza rendre 217, 219, 258 és 278 pm. A viszonylagos ezüst-nitrogén kötéseerősségek tehát a következők:



A fenti sorrend visszatükröződik az V. táblázatból: negatívabb potenciál egy atom körül erősebb kötés kialakulására mutat. Ez a megállapítás nem érvényes az AgO-kötésre, mely igen gyenge. A kovalens rádiuszokból számított standard kötéshossz csak 218 pm. Az ellentmondást okozhatja az, hogy az elektrosztatikus közelítés nem feltétlenül alkalmas fémionok kötéseenergiájának becslésére /5/. Esetleg a kristálytér is szerepet játszhat a kötéshossz meghatározásában. Legvalószínűbb azonban az, hogy a kötésjárulék-módszer túlbecsüli a potenciált az oxigénion környezetében.

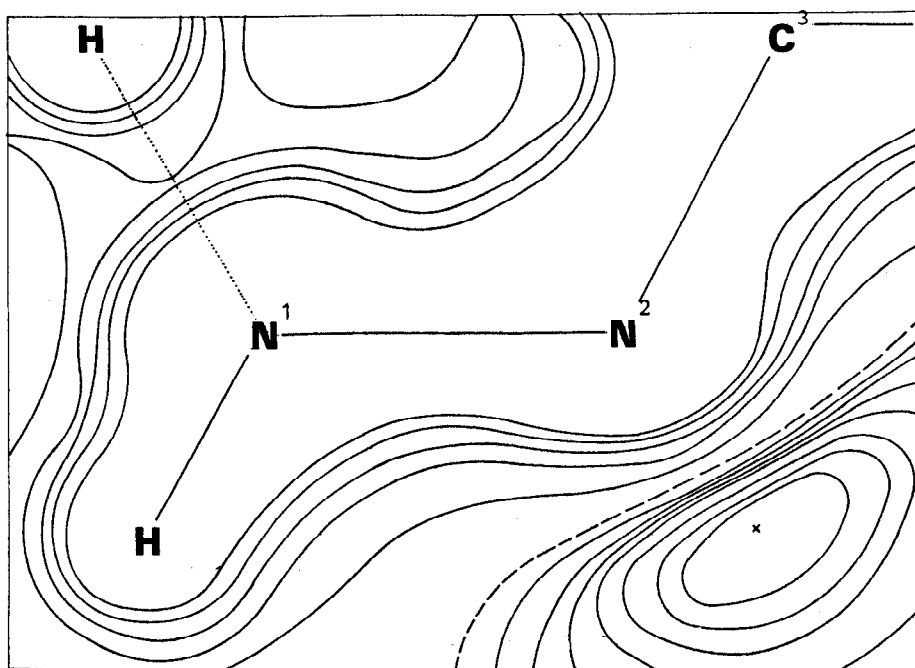
Az elektrosztatikus potenciál negatív tartományainak elhelyezkedése alapján hidrogénhid-kötések térszerkezetére vonatkozó felvilágosítást is kaphatunk /3/. Erre példa a Hutton és munkatársai által tanulmányozott 3-karboximetiltio-1,5-difenil-

-formazán /46/. A molekula kloroformos oldatban sajátos intramolekuláris hidrogénhiddal stabilizált szerkezetet vesz föl (15. ábra). Meghatároztam a



15. ábra. 3-Karboximetiltio-1,5-difenilformazán térszerkezete Hutton és munkatársai szerint /46/ (üres vonal), illetve az elektrosztatikus potenciáltérkép alapján (tele vonal).

formazán-gyűrű elektrosztatikus potenciáltérképét a kötésjárulék-módszerrel /47/ (16. ábra). Ennek alapján kiderül, hogy az eredetileg javasolt, szimmetrikus szerkezet nem jöhet létre, mert a gyűrű belsejében pozitív potenciáltartomány alakul ki, mely taszítja az OH-kötés pozitív hidrogénatomját. Ehelyett aszimmetrikus térállás valósul meg, melyben a hidrogén a 2-es vagy a 4-es nitrogénatom magányos párjától származó, negatív potenciáltartományban tartózkodik.



16. ábra. A formazán-gyűrű elektrosztatikus potenciáltérképe a molekula síkjában. A szaggatott vonal mentén a potenciál zérus, ettől jobbra lent a kihuzott vonalak rendre -40, -80, -120, -160, -200, -240 és -280, balra fent pedig 400, 800, 1200, 1600 és 2000 kJ/mol-nak felelnek meg.

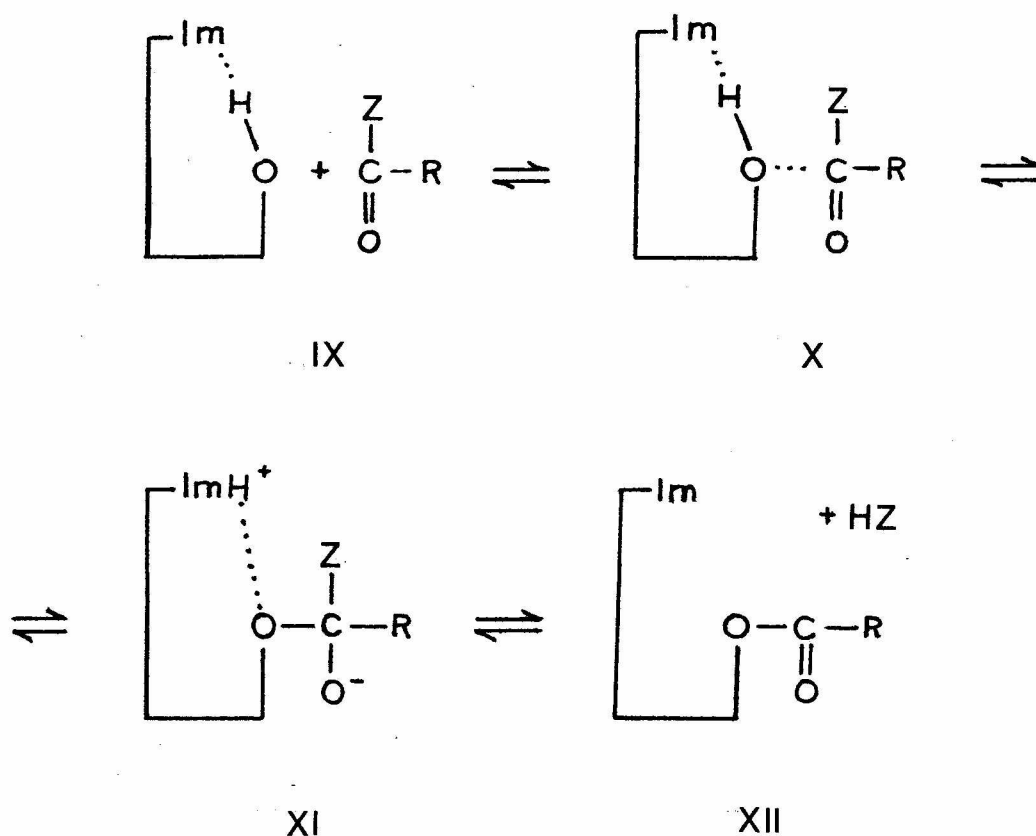
4. Biokémiai alkalmazások

A biopolimerek, például a fehérjék vagy a ribonukleinsavak szerkezetének és reakcióinak kvantumkémiai vizsgálata sok szempontból különbözik a kis molekulákétól /48/. Az elméleti szerves kémia számos kérdését jól definiált modelleken tanulmányozhatjuk, gyakran elhanyagolhatjuk az oldószer hatását és általában nem jelent nehézséget a kísérleti eredmények értelmezése. A biopolimerek több ezer atomot is tartalmazhatnak, ezért alapvető jelentőségű a megfelelő számítási módszer kiválasztása. Ritkán vezet eredményre egy-egy fontosabbnak tartott funkciós csoport elkülönített vizsgálata, a fehérje vagy a DNS többi atomjának és a vizes oldószernek a hatása nem egyszer döntő mértékben befolyásolja a molekulaszervezetet és a reakciók kimenetelét. Ezért a kvantumkémia biológiai alkalmazásainál nem érdemes arra törekedni, hogy valamely, többé-kevésbé önkényesen kiválasztott molekularészletre a lehető legpontosabb számításokat végezzük, hanem különös figyelmet kell fordítani a modell helyes megválasztására. Mivel a valóság-hű modell általában igen sok atomot tartalmaz, le kell mondanunk a pontos kvantumkémiai módszerek használatáról és egyszerűbb

közelítésekre kell hagyatkoznunk. Ilyen a kötésjárulék-módszer is, mely gyorsasága folytán szinte tetszés szerinti nagy molekulásulyu biopolimerekre alkalmazható. Ebben a fejezetben a szerin-proteázok által katalizált reakciókról lesz szó. Először összefoglalom a legújabb kísérleti eredmények alapján elfogadott működési mechanizmust, majd ismertetem az elméleti eredményeket, melyek ennek egy-egy részletére vonatkoznak (lásd a /48, 49/ összefoglaló munkákat).

4.1. Szerin-proteázok működési mechanizmusa

A szerin-proteázok peptideket és észter- vagy amidkötéseket tartalmazó molekulákat hidrolizálnak egy különösen aktív szerin oldallánc hidroxil-csoportja segítségével. Két családjuk ismeretes, melyek eltérő evolúciós uton alakultak ki, aminosav-szekvenciájuk egymástól különböző, csak az aktív hely szerkezete hasonló. A tripszin-család gerincesekben, a szubtilizin pedig baktériumokban található. A hidrolízis sematikus mechanizmusa a 17. ábrán látható /50/. Az aktív szerin oldallánc hidroxil-csoportja nukleofil támadást intéz az amid- vagy észter-csoport karbonil-szénatomja ellen és egy lazán kötött Michaelis-komplexen (X) keresztül kialakul a tetra-



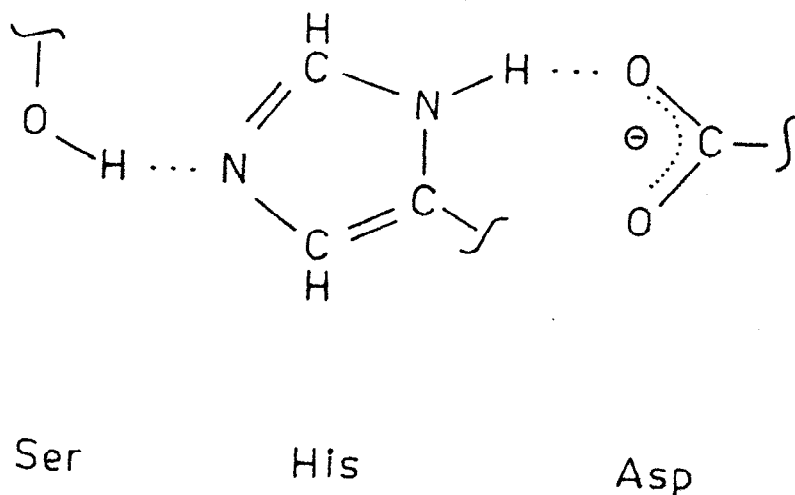
17. ábra. A szerin-proteázok által katalizált hidrolitikus reakciók sémája. Z = R'NH vagy R'O.

X: Michaelis-komplex, XI: tetraédes intermedier, XII: acil-enzim.

édes intermedier (XI). A reakció során egy proton megy át a szerinről a szomszédos imidazolra. Ezután a tetraédes intermedier elhidrolizál, ekkor Z = OH, a reakció a fordított irányban megy végbe és az enzim regenerálódik.

Az α -kimotripszin /51/, majd számos szerin-proteáz /52-56/ röntgendiffrakciós vizsgálata révén felderítették az enzim térszerkezetét, ezáltal megnyílt

az ut a működési mechanizmus részleteinek tisztázásához. Valamennyi szerin-proteázban megtalálható a Ser-His-Asp katalitikus triád (18. ábra), mely hidrogénhidakkal kapcsolódik össze. Blow és munkatársai



18. ábra. A szerin -proteázok katalitikus triádja (sematikusan).

szerint /57/ a szerin-proteázok különösen erős katalitikus hatása arra vezethető vissza, hogy a reakció során az "eltemetett" aszpartát irányában kettős protonátmenet következik be és a negatív töltés a szerinre tolódik (charge relay). A töltésátmenet során kialakuló alkoxidion nukleofil ereje jelentősen megnő, ez okozza a sebességnövekedést. Ezt az elképzelést mágneses magrezonancia-spektroszkópiai mérések is alátámasztani látszóttak /58/, azonban egyes szerzők reakciókinetikai megfontolások alapján

elvetették /59, 60/. Pontosabb NMR- és neutron-diffrakciós mérések /61-63/ azonban bizonyították, hogy a katalizis során a proton az imidazol-oldalláncon marad és His⁺...Asp⁻ ionpár alakul ki.

A kísérleti vizsgálatok nem adtak választ néhány olyan kérdésre, melyet kvantumkémiai módszerekkel a siker reményében lehet tanulmányozni. Ezek közül az alábbiakról lesz szó a következő alfejezetekben:

- milyen tényezők stabilizálják a His⁺...Asp⁻ ionpárt a katalizis során;
- mivel magyarázható a rendkívül jelentős katalitikus sebességnövekedés;
- eltekintve a katalitikus triád azonosságától, felfedezhető-e rokonság a szerin-proteázok két családja között;
- játszanak-e szerepet az enzim környezetében található ellenionok a katalizisben.

4.2. Protonátmeneti egyensúly a szubtilizin His-64 ...Asp-32 diádjában

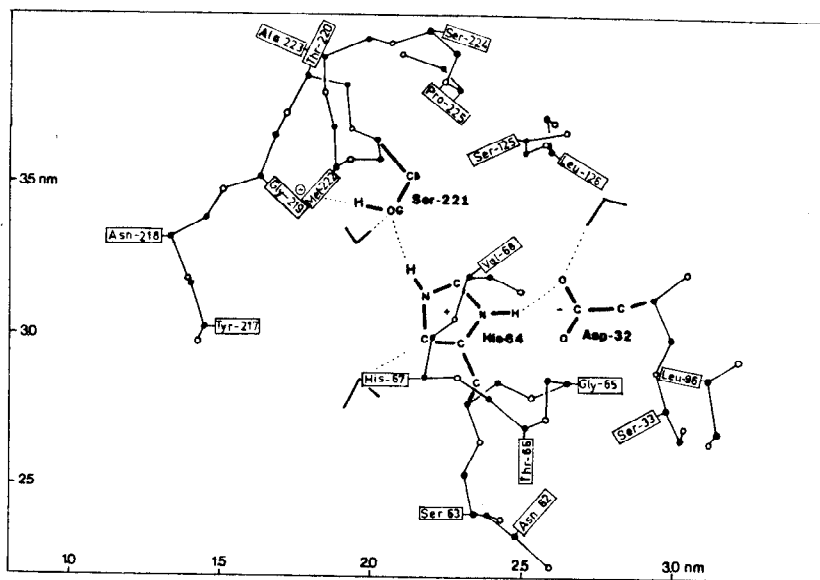
A szerin proteázokra végzett kvantumkémiai kutatások jelentős része a katalitikus triád protonátmeneti egyensúlyával foglalkozik. CNDO/2 /64-66/, PRDDO /67-68/ és ab inició STO-3G /27, 37/, illetve 4-31G /27, 69, 70/ számítások szerint az aszpartát

és nem a szerin oldallánc ionizált a nativ enzimben, a szubsztrát távollétében. Ez az eredmény, mely egyébként a vizes oldatban mért pK értékek összehasonlításából nyilvánvalónak látszik, reprodukálható a kötésjárulék-módszeren alapuló, egyszerűsített számításokkal is /71/. Eszerint a protonátmenet a szubtilizin Ser-221 O^Y-atomjáról a His-64 N^{ε2}-atomjára 243 kJ/mol energiabefektetést igényel. Beppu és Yomosa CNDO/2 számításai szerint /66/ a fenti érték 209 kJ/mol, míg Kollman és Hayes ab ini- ció módszerrel, STO-3G, illetve 4-31G bázissal 222, illetve 114 kJ/mol értékeket kapott /27/. Valamennyi számításból kitűnik tehát, hogy a Ser...His protonátmenet jelentős energiabefektetést igényel.

Felmerül a kérdés, hogy mennyire jogos a katalitikus triádot elkülönítve tárgyalni, milyen hatása van a fehérje-környezetnek és a hidrátburoknak a protonátmeneti egyensulyra. Régóta ismeretes, hogy a fehérjék erős elektrosztatikus teret keltenek maguk körül /25, 72-75/, és ez a tér jelentősen befolyásolja az enzimek működését is: karboxipeptidáz A /76/, lizozim /77/, papain /78/, máj-alkohol de- hiderogénáz /79/, szén-anhidráz /80/. Szerin-proteázokra az első ilyen tárgyú publikációk 1980-ban jelentek meg /37, 81, 82/. Valamennyi szerint a fehér-

je elektrosztatikus tere kedvez a Ser...His protonátmenetnek a szubsztrátmentes enzimben. A katalitikus triád közvetlen környezetébe tartozó 18 aminosav-részlet hatására a protonátmenet energiája 55 kJ/mol-lal csökken /81/. Nyilvánvaló tehát, hogy a protonok helye kvantumkémiailag számításokkal csak úgy határozható meg, ha figyelembe vesszük a környezet elektrosztatikus terét is.

A protonálódás helyének rendszeres vizsgálata céljából CNDO/2 /82/ és ab inició /83/ módszerrel számításokat végeztünk a tetraédes intermedier egyszerű modelljére, mely a 19. ábrán látható. A szubsztrátot protonnal helyettesítettük, töltését egy negatív, pontszerű ellenion kompenzálja. Ez felel meg a XI szerkezetben látható, negatív oxigénatomnak, míg a proton a szerin oxigénjéhez csatlakozó szén képviseli. Az első hidrátburkot három vízmolekula alkotja, ezek helyére röntgen-diffrakciós mérések /51/, illetve a kémiai szemlélet alapján lehetett következtetni. A fehérje nehéz atomjainak koordinátáit Alden és munkatársainak cikkéből vettük /53b/, a hidrogénatomok és hipotetikus magányospár-centrumok helyét a XANADU programmal határoztuk meg /84/.



19. ábra. A tetraédeses intermedier modellje. A szén- és nitrogénatomokat tele, illetve üres körök jelölik, egyszerűség kedvéért csak a legfontosabb hidrogénatomok láthatók. Az első hidratburokhoz tartozó három vízmolekulát V-alaku vonalak jelképezik.

A His-64...Asp-32 diádban végbemenő protonátmenet energiáját az alábbi képlettel becsültük meg:

$$\Delta E = \Delta E_d + \Delta E_f + \Delta E_h + \Delta E_e \quad (19)$$

Itt ΔE_d a diádot modellező imidazol-hangyasav rendszer ionpár- (ip, $\text{ImH}^+ \dots ^-\text{OOCH}$), illetve semleges (s, $\text{Im}\dots\text{HOCH}$) formája közötti energiakülönbség gázfázisban, $\Delta E_d = E_d(\text{ip}) - E_d(\text{s})$. ΔE_f , ΔE_h és ΔE_e

rendre a fehérje-környezet, a hidrátburok és az ellenion elektrosztatikus terétől származó energiováltozás.

ΔE_d meghatározására CNDO/2 /82/ és ab inició számításokat végeztünk minimális STO-3G bázissal és a geometria részleges optimalizálásával /83/. Mindkét közelítés tulbecsüli a semleges forma stabilitását, melynek az az oka, hogy minimális bázissal a negatív ionok (pl. HCOO^-) protonaffinitását csak viszonylag jelentős hibával lehet kiszámítani /85/.

Mivel a protonátmeneti energiák megbízhatóan csak nagy bázissal (pl. 6-31G^x) reprodukálhatók /86/, ilyennel pedig a 66 elektront tartalmazó Im...HOCH rendszer esetében nem tudtunk számolni, korrekciók figyelembevételével próbáltuk ΔE_d pontos értékét megbecsülni. A diád energiája a következő alakban írható (a felső index a számításnál használt bázisra vonatkozik):

$$E_d(\text{ip}) = E_{\text{ImH}^+}^{4-31\text{G}} + E_{\text{HCOO}^-}^{4-31\text{G}} + E_{\text{kölcsés}}(\text{ip}) \quad (20a)$$

$$E_d(\text{s}) = E_{\text{Im}}^{4-31\text{G}} + E_{\text{HCOOH}}^{4-31\text{G}} + E_{\text{kölcsés}}(\text{s}) \quad (20b)$$

ahol az alsó index a diád molekuláinak megfelelő alakját jelöli. $E_{\text{kölcsés}}$ a kölcsönhatási energia, melyet az alábbi közelítő kifejezéssel számíthatunk ki:

$$E_{k\ddot{o}lcs}(ip) = [E_d^{3G}(ip) - E_{ImH^+}^{3G} - E_{HCOO^-}^{3G}] \alpha \quad (21a)$$

$$E_{k\ddot{o}lcs}(s) = [E_d^{3G}(ip) - E_{Im}^{3G} - E_{HCOOH}^{3G}] \alpha \quad (21b)$$

α korrekciós tényező, melynek értéke 0,67 és 0,83 között változhat. Čársky és Urban szerint ugyanis hidrogénhid-kötéssel kapcsolódó molekulák kölcsönhatási energiáját STO-3G bázissal az egzakt értékhez képest 20-50%-kal túlbecsüljük (/86/ 186. old.). Az Im, ImH⁺, HCOOH, HCOO⁻ molekulák geometriáját a CNDO-erő módszerrel optimalizáltuk /35/, a diád esetében a fenti geometriákból kiindulva, csak a kölcsönható molekulák egymástól számított távolságát változtatva kerestük az energiaminimumot. A környezettől származó energiaváltozást az (1) egyenlettel közelítettük:

$$E_x(m) = \epsilon_x^{-1} \sum V_x(\underline{r}_i) q_m^i \quad (22)$$

Az x index a fehérjét (f), a hidrátburkot (h) vagy az elleniont (e) jelképezi, $m = ip$ vagy s . ϵ_x az effektív dielektromos állandó, melyet a hidrátburok és az ellenion esetében 1-nek vettünk, ezeknél ugyanis a diád és a környezet között vákuum van, a V_x potenciált nem árnyékolja semmi. A fehérje esetében $\epsilon_x = 1,36$ értéket választottunk /77/. A q_m^i atomtöltéseket CNDO/2 vagy ab inició számításból kaptuk STO-3G bázissal.

VI. táblázat. A (20-22) egyenletek energiatagjai a diád két formájára (kJ/mol). A "CNDO" és "3G" felső indexek a számítási módszert jelölik. A táblázat végén a felső sor a CNDO/2, az alsó az ab inició, STO-3G bázissal számított atomtöltéseknek felel meg.

energiatag	ionpár	semleges forma
$-E_{\text{CNDO}}$	243.674	243.915
$-E_d^{\text{3G}}$	1.071.219	1.071.485
E_{int}/α	-496	39
$-E_d$ ($\alpha=0,67$)	1.083.809	1.083.910
$-E_d$ ($\alpha=0,83$)	1.083.889	1.083.904
$-E_f \cdot \varepsilon_f$	62 125	4 64
$-E_h$	34 39	10 18
$-E_e$	77 51	21 1

A számszerű eredményeket a VI. és VII. táblázatban foglaltam össze, Feltűnő, hogy ΔE_f , ΔE_h és ΔE_e értéke igen közel esik egymáshoz akár a CNDO/2, akár az ab inició módszerrel, STO-3G bázissal számítjuk ki az atomi töltéseket. Mint említettem, a (21) egyenletben szereplő α korrekciós tényező értéke bizonytalan, valószínű azonban, hogy a pontos érték a két határ közé esik. Ebből következik, hogy a diád protonátmeneti energiája, mely gázfázis-

VII. táblázat. A diád szerkezeti egységeinek összes energiája, protonálódási energiája és a protonátmenet energiája különböző közelítésekkel, a (19-22) egyenletekből számolva (kJ/mol)

molekula, ill. mennyiség	CNDO/2	ab inició	
		3G bázis	4-31G bázis
Im	-124.925	-582.712	-589.213
ImH ⁺	-126.359	-583.898	-590.241
HCOO ⁻	-116.787	-486.825	-493.236
HCOOH	-118.779	-488.812	-494.723
$E_{\text{ImH}^+} - E_{\text{Im}}$	-1.435	-1.186	-1.028 ^a
$E_{\text{HCOOH}} - E_{\text{HCOO}^-}$	-1.992	-1.987	-1.487 ^b
ΔE_d	241	266	15...101 ^{c, d}
ΔE	118	150	-101...-15 ^e

^a Hayes és Kollman -920 kJ/mol-ra becsülte a kísérleti értéket /37/

^b Scheiner et al. szerint /67/ -1.499 kJ/mol, Umeyama és Nakagawa szerint /71/ -1.504 kJ/mol, a kísérleti érték /87/ -1.430 kJ/mol

^c a (20-21) egyenletekből

^d Kollman és Hayes /27/ 80 kJ/mol-t kapott

^e a (19-22) egyenletekből

ban pozitív, a tetraéderes intermedier többé-kevésbé pontos modelljére negatívnak adódik. Másszóval: a környezet stabilizálja a HisH⁺...Asp⁻ ionpárt a szubtilizinben. A 116 kJ/mol stabilizációs energiából 58, 24 és 56 kJ/mol esik a fehérjére, a hidrátburokra és az ellenionra. Ezekből a számokból lát-

szik, hogy a fehérje elektrosztatikus terét nem lehet figyelmen kívül hagyni a protonátmenet tárgyalásánál.

Tekintsük most át a bemutatott modell és számítási módszer korlátait. A legfontosabb hibaforrások a következők:

- a (20-21) egyenletek hibája;
- a kötésjárulék-módszer hibája;
- a diád környezettől származó elektrosztatikus polarizációjának elhanyagolása;
- a (22) egyenletben szereplő ϵ_f dielektromos állandó helytelen választása.

A 2.2. alfejezetben említettem, hogy a kötésjárulék-módszer túlbecsüli a potenciált és annak változását, tehát a környezet stabilizáló hatását az ionpárra. Ugyanilyen előjelű a hiba, ha ϵ_f értéket túl kicsire választottuk (nem valószínű, hogy túl nagy lenne, mert a minimális érték 1). Ezzel szemben alulbecsüljük $|\Delta E_x|$ -et a polarizációs járulék elhanyagolása miatt, mely elég jelentősen növeli a stabilizációs energiát (lásd a 2.2. alfejezetet). A polarizáció szerepe a semleges forma stabilizálásánál lényegesen kisebb, mint az ionpárnál, ezért ha elhagyjuk, $|E_x(ip)|$ és $|\Delta E_x|$ a valóságosnál kisebb lesz.

A fent felsorolt hibák előjele különböző, ezért részben kiegyenlítik egymást. Néhány kevésbé fontos hibaforrás a következő:

- a tetraéderes intermedier durva modellezése;
- bizonytalanság az aktiv hely geometriájában, valamint az elektronkorreláció és a zérus-pont-energia elhagyása;
- az entrópia-változás elhanyagolása.

A hibák nagyságát nehéz megbecsülni, de különböző modell-számítások alapján valószínű, hogy elhanyagolhatók /83/.

Ennek az alfejezetnek az elején utaltam rá, hogy nem feltétlenül helyes, ha a protonátmeneti egyensúlyt az ionpárt alkotó molekulák savi disszociációs állandója alapján akarjuk leírni. Ha a különbség a pK-értékek között nagy, esetleg helyes következtetésekhez jutunk, de általában döntő szerepet játszik a kölcsönhatási energia jelentős eltérése a semleges és az ionpár-forma esetében (lásd a VII. táblázatot). Ugyanilyen fontos a környezet hatása, melyet a "hidrofobicitás" és "hidrofilicitás" pontatlanul meghatározott fogalmaival nehéz helyesen leírni.

Összefoglalva a leirtakat, megállapítható, hogy a kvantumkémiai számítások segítségével "a posterio-

ri" reprodukálható a kísérleti tapasztalat: a szerin-proteázok "eltemetett" aszpartát-oldallánca nem protonálódik a katalízis során. Ennek legfontosabb oka a fehérje-környezet elektrosztatikus stabilizáló hatása. Szinte bizonyosra vehető, hogy valamennyi enzimreakció tárgyalásánál, melyek során töltött vagy erősen poláris szerkezetek alakulnak ki, figyelembe kell venni a fehérje elektrosztatikus terét. Óvatosan kell tehát kezelni azokat a megállapításokat, melyeket az enzimreakciók alkalmas modelljének tekintett, egyszerű szerves kémiai folyamatok tanulmányozása során kaphatunk.

4.3. Reakciósebességnövelő tényezők a szerin- -proteázok működésénél

A 4.1. alfejezetben szó volt arról, hogy a legújabb kutatások szerint nem állja meg a helyét a töltésátviteli hipotézis: a katalitikus triádhoz tartozó aszpartát töltése nem tolódik át a szerinre. Nem nőhet meg tehát az oldallánc nukleofil ereje az alkoxidion kialakulása révén, másutt kell keresni az enzimaktivitás eredetét. Polgár /88/ még 1972-ben felhívta a figyelmet arra, hogy a negatív töltésű aszpartát elektrosztatikus terével stabilizálhatja a tetraéderes intermedier és az imidazólium kation

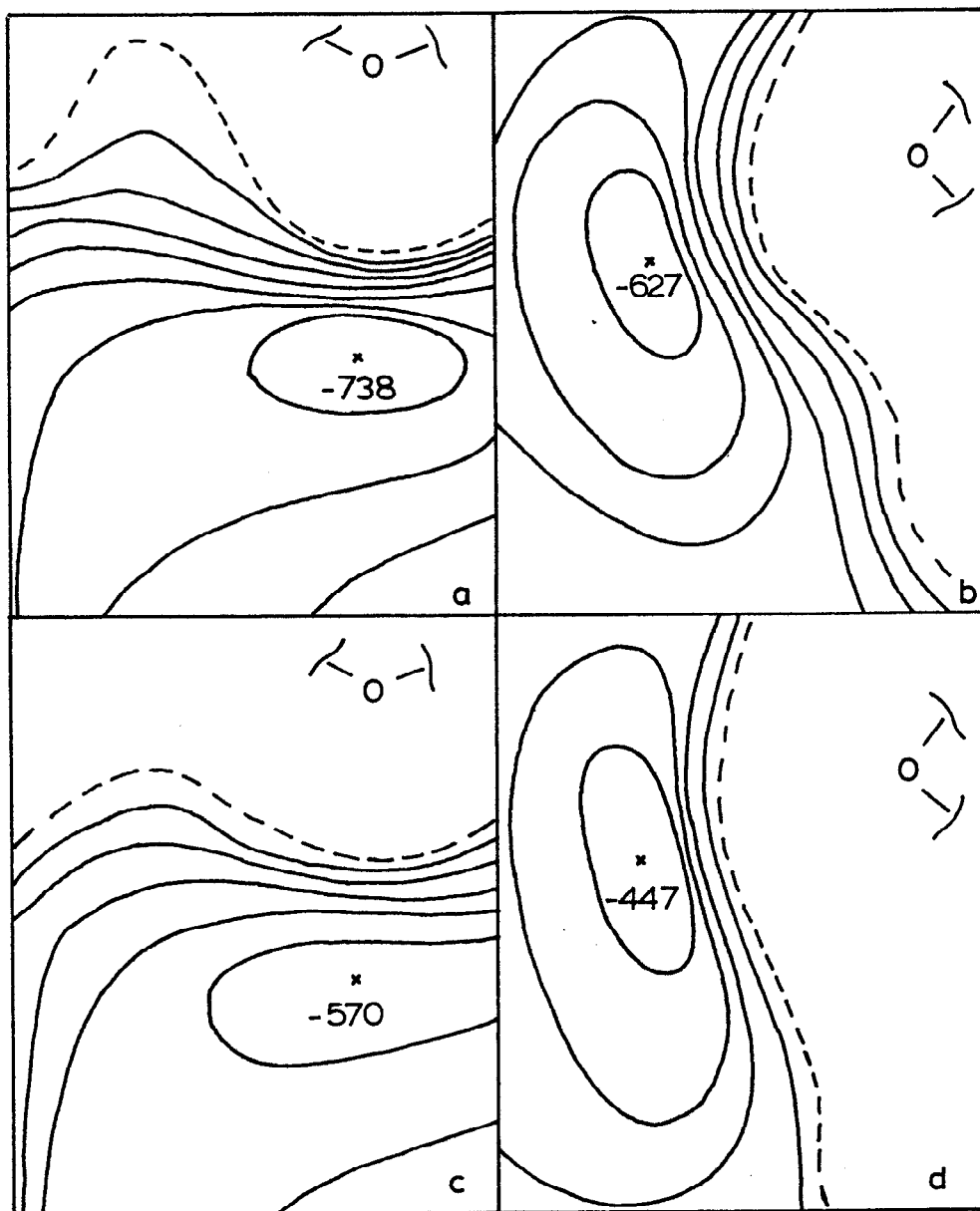
alkotta ionpárt. Az átmeneti állapot ezen stabilizációja révén alakul ki a katalitikus hatás akkor, ha a hidrolitikus reakció sebességmeghatározó lépése az acilenzim képződése ($X \rightarrow XI \rightarrow XII$ lépés a 17. ábrán). Ezt a hipotézist ellenőriztem kvantumkémiai módszerekkel /89, 90/.

Az első kérdés: változik-e az aktiv szerin hidroxilcsoportjának nukleofil ereje az "eltüntetett" aszpartát hatására annak ellenére, hogy protonátmenet nem következik be. Ennek eldöntésére kiszámítottam az elektrosztatikus potenciált a hidroxilcsoport környezetében az α -kimotripszinben és a szubtilizinben. Az (1) egyenlet szerint adott atom körül kialakuló elektrosztatikus potenciál minimális értéke - mint a maximális kölcsönhatási energia mérőszáma egy pontszerű pozitív töltéssel - jellemzi az illető atom nukleofil erejét. Negatívabb potenciál tehát nagyobb nukleofil erőnek felel meg.

Az α -kimotripszint az aktiv hely körül található alábbi aminosavak együttesével modelleztem a koordináták a Protein Data Bankból származnak /20, 91/: Ile⁺-16, Phe-41...Gly-43, Thr-54...Val-60, Tyr-94...Thr-104, Gly-193, Asp⁻-194...Gly-197, Ile-212...Gly-216. Az Ile α -aminocsoportja sóhidat

képez a 194-es aszpartát oldalláncával. A szubtilizin modelljéül a 19. ábrán bemutatott enzimrészletet választottam azzal a különbséggel, hogy elhagytam a protont a His-64-ről, valamint az elleniont és a hidrátburkot, ugyanakkor kissé megváltoztattam a konformációt: a Ser-221 O-H...N hidrogénhiddal kapcsolódik a His-64 N^{ε2}-atomjához. Hasonló szerkezetet feltételeztem az α-kimotripszin Ser-195... His-57 diádja esetében is. Az aszpartáton lévő töltés szerepének tisztázása céljából meghatároztam a potenciáltérképet a két említett enzim olyan modelljeire is, melyekben Asp helyett Asn oldallánc van a katalitikus triádban.

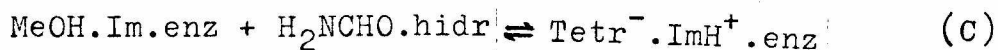
Az egyes modellekre kiszámított potenciáltérképeket a 20. ábra mutatja. A primér szerkezet különbözősége folytán eltéréseket láthatunk a két enzim között. Az aktiv hidroxilcsoport nukleofil ereje nagyobb az α-kimotripszinben, mint a szubtilizinben. Ez a nukleofil erő azonban jelentősen csökken, ha a katalitikus triád aszpartátját aszparaginra cseréljük. Összehasonlításképpen meghatároztam a potenciál minimumát a szabad metanol körül is, mely az enzimmel azonos geometriát és a magányos párok azonos irányítását feltételezve -451 kJ/mol. E szerint a nukleofilicitás növekedése a szubtilizin-



20. ábra. Elektrosztatikus potenciál az α -kimo-
tripszin (a) és a szubtilizin (b) aktiv hidroxil-
csoportja körül. A megfelelő térképeket a hipote-
tikus modellekre, melyekben az Asp^- oldalláncot
 Asn helyettesíti a (c) és a (d) ábrák mutatják, a
minimumokat kereszt jelöli. A szaggatott vonal
mentén a potenciál zérus, a többiek rendre -100,
-200, -300, -400, -500 és -600 kJ/mol-nak felelnek
meg.

ben egyedül az "eltemetett" aszpartát elektrosztatikus téreffektusára vezethető vissza. A 3.1. és 3.2. alfejezetben bemutatottak mellett tehát egy biokémiai példát is láthatunk, ennek az effektusnak a fontosságára. Érdekes, hogy az α -kimotripszinben nemcsak az aszpartát, hanem más oldalláncok is hozzájárulnak a nukleofil erő növeléséhez. Amidon CNDO/2 számítások alapján rámutatott arra, hogy az aszpartát jelenléte 14 millielektronnal növeli a szerin-oxigén nettó töltését /64/. Ez azonban elhanyagolható az elektrosztatikus téreffektus mellett, ugyanis a 20. ábrán jelölt minimumok helyén mindössze 19 kJ/mol potenciálcsökkenésnek felel meg. Ezzel szemben a potenciál csökkenése az aszpartát hatására az α -kimotripszinben 168, a szubtilizinben 180 kJ/mol.

Az aszpartát tetraéderes intermedierre kifejtett stabilizáló hatása pontosabban is megbecsülhető. CNDO/2 szemempirikus módszerrel számításokat végeztem a szubtilizin aktiv helyének modelljére, mely a 19. ábrán feltüntetett aminosavakat és a hidrátburok első héját foglalja magában. Legfontosabb részletét a 21. ábra mutatja. A tetraéderes intermediert formamid-kompleksszel helyettesítettem, ez közelebb áll a valósághoz, mint a fentebb tárgyalt modell. A számítással a következő reakciók energia-



Tetr⁻ a MeOCH(NH₂)O⁻ összetételű tetraédes intermediert jelenti (21. ábra). "hydr" a hidrátburok, mely a vizes közegben lejátszódó, analóg reakció környezetét modellezi. A MeOH.Im és a Tetr⁻.ImH⁺ rendszert hat, illetve kilenc vízmolekula veszi körül. Ezek hidrogénhid-kötést létesítenek a CG, ND1, CD2, NE1 és OG, illetve a CG, ND1, CD2, CE1, OT és az NT atomokkal. "enz" jelenti az enzimmag és a hidrátburok együttesét. Utóbbit a MeOH.Im szerkezet esetében csak négy, a Tetr⁻.ImH⁺ formánál pedig öt vízmolekula alkotja (21. ábra). A (B) reakcióban figyelembe vett vízmolekulák helyét ugyanis részben az enzim oldalláncai foglalják el. Az "eltüntetett" aszpartát szerepének tisztázása céljából végeztem egy olyan számítást is, melynél ezt kihagytam az enzimmagból. A MeOH.Im és a Tetr⁻.ImH⁺ szerkezetek, valamint a formamid-molekula geometriáját a CNDO/2 módszer erő-változatával optimalizáltam /35/, a kiindulási adatokat a 4.2. alfejezet elején leírtak szerint kaptam.

A számítási eredményeket a VIII. és a IX. táblázatban foglaltam össze. Az (A-C) reakciók során bekövetkező energiaváltozások a következőképpen számíthatók ki (Fa: formamid):

$$\Delta E_A = E_{\text{CNDO,ip}} - E_{\text{CNDO,s}} - E_{\text{CNDO,Fa}} \quad (23)$$

VIII. táblázat. A környezettől származó elektro-
sztatikus potenciál a $\text{Tetr}^- \cdot \text{ImH}^+$ komplex atomjai-
nak helyén (kJ/mol). Az atomtöltések millielektron-
ban értendők.

atom	potenciál						nettó töltés	
	fehérje		hidrátburok				semleges ionpár	
	a	b	c	d	e	f		
CB	105	318	-25	-21	0	0	161	228
OG	38	247	75	-51	50	-50	-258	-355
H1(CB)	121	327	33	13	13	67	-33	-14
H2(CB)	g	g	g	g	20	30	-37	-100
H3(CB)	8	255	-4	-17	-33	8	-23	-32
OT	155	310	--	0	--	113	--	-620
NT	17	201	--	-109	--	-88	--	-299
H1(NT)	8	201	--	-172	--	-159	--	28
H2(NT)	17	180	--	-180	--	-138	--	64
CT	46	247	--	-50	--	-4	--	449
H(CT)	59	260	--	-59	--	-21	--	-221
CE1	-155	201	-88	-118	-159	-163	161	235
H(CE1)	-209	155	-222	-264	-276	-272	-13	85
ND1	-201	226	-59	-80	-184	-184	-96	-55
H(ND1)	-318	222	-46	-63	-293	-285	117	170
CG	-147	193	-59	-75	-184	-193	15	40
H(CG)	g	g	g	g	-306	-320	9	51
CD2	-63	201	-84	-116	-155	-176	42	64
H(CD2)	-71	155	-193	-255	-247	-285	-10	54
NE2	-67	201	-50	-92	-105	-134	-193	-100
H(NE2)	-29	218	--	-76	--	-109	--	328
H(OG)	-21	230	0	--	-29	--	158	--

^a Asp-32 oldallánccal

^b Asp-32 oldallánc nélkül

^c 4H₂O a Ser-His diádra

^d 5H₂O a tetraéderes inter-
medierre

^e 6H₂O MeOH·Im-re

^f 9H₂O Tetr⁻·ImH⁺-ra

^g a fehérjébe ágyazott
modellből elhagyva

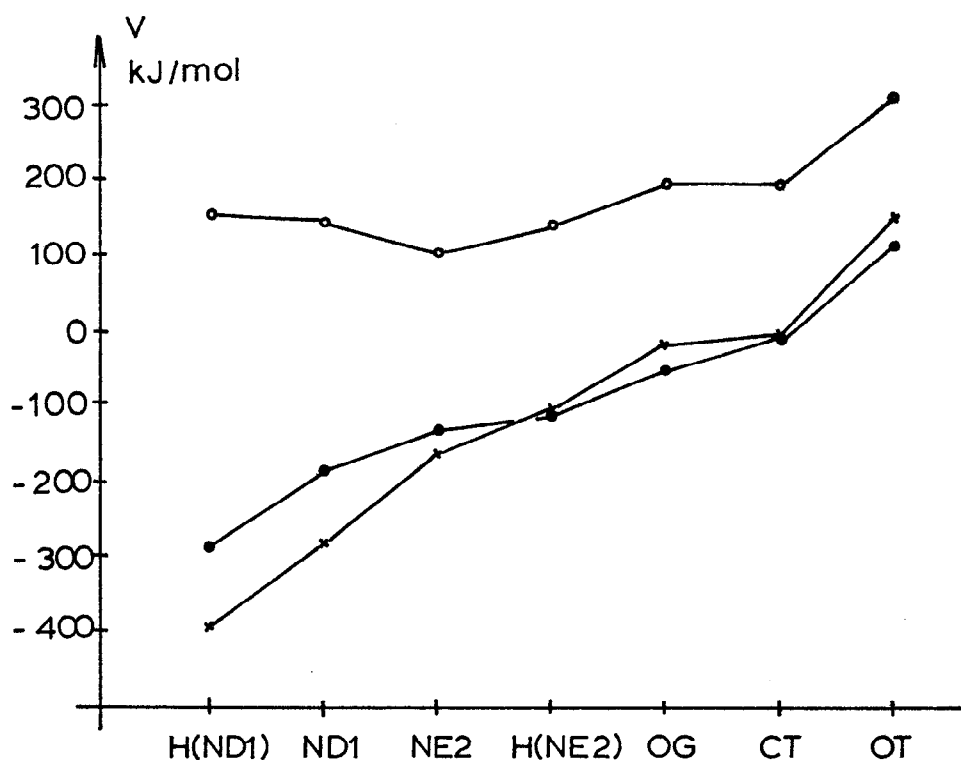
$$\Delta E_B = \Delta E_A + E_{hydr,ip} - E_{hydr,s} - E_{hydr,Fa} \quad (24)$$

$$\Delta E_C = \Delta E_A + E_{enz,ip} - E_{enz,s} - E_{hydr,Fa} \quad (25)$$

E_{CNDO} a CNDO/2 módszerrel számított energia, E_{hydr} és E_{enz} a hidrátburoktól, illetve a környezettől származó energia, melyet a VIII. táblázat adatainak felhasználásával, az (1) egyenlet alapján számítottam ki.

A IX. táblázat adataival $\Delta E_A = -601$ kJ/mol, a hidratált modellre $\Delta E_B = -720$ kJ/mol. A vizes közeg tehát stabilizálja a tetraéderes intermediert. További stabilizáció tapasztalható az enzimben, ahol $\Delta E_C = -767$ kJ/mol. A 47 kJ/mol nyereség az enzimben a vizes oldathoz képest kb. 10^8 -szoros sebességnövekedésnek felel meg, mely közel esik a kísérleti értékhez /50/. A 22. ábrán látható a potenciál változása a tetraéderes intermedier mentén. Ez OT-től IX. táblázat. A (23-25) egyenletekben szereplő energiátagok (kJ/mol)

	$-E_{CNDO}$	$-E_{hydr}$	$-E_{enz}$
Tetr ⁻ .ImH ⁺ vagy a tetraéderes intermedier (ip)	303.479	213	274
MeOH.Im vagy Ser...	199.627	46	60
His diád (s)			
H ₂ NCHO (Fa)	103.251	48	--



22. ábra. Az elektrosztatikus potenciál változása a tetraédres intermedier mentén. A pont, a kereszt és az üres kör rendre a hidratált modellnek és a fehérje környezetnek felel meg az "eltemetett" aszpartáttal, illetve anélkül.

H (ND1) felé haladva csökken, tehát az elektrosztatikus tér stabilizálja a durván (- +) töltéseloszlásnak tekinthető $\text{Tetr}^- \cdot \text{ImH}^+$ szerkezetet. Nagyobb a csökkenés, tehát a stabilizáció az enzimben, mint

a vizes oldatban (536, illetve 398 kJ/mol). Ha az enzimből kihagyjuk a negatív töltésű Asp-32 oldal-láncot, a katalitikus triád harmadik tagját, a potenciál csökkenése csak 151 kJ/mol (lásd a VIII. táblázatot). Emiatt a stabilizációs energia is lényegesen csökken, $\Delta E'_C = -658$ kJ/mol, kisebb, mint vizes oldatban.

A fenti számítás során a következő lényeges elhanyagolásokat tettem:

- a CNDO/2 szemempirikus módszer használata;
- a polarizáció elhanyagolása;
- a hidrátburok második és további héjainak elhagyása.

Mivel a (23-25) egyenletek a viszonylagos stabilizációs energiát adják meg. ΔE_A hibája, melyet a CNDO/2 módszerrel kaptam, nem játszik szerepet a további következtetésekben. A környezet stabilizációs energiáját elsősorban a ponttöltések (multipólus-nyomatékok) szabják meg, ezeket a CNDO/2 módszer megbízhatóan reprodukálja /15/. Az esetleges hibák nagy valószínűséggel - legalább részben - kiegyenlítődnek ΔE_B és ΔE_C összehasonlításánál. A polarizáció egyaránt stabilizálja a diád semleges és ionpár-formáját. A stabilizációs energia párhuzamosan nő a környezet elektrosztatikus terének

erősségével /92/, ezért ez nagyobb az enzimen, mint a vizes oldatban. Elhanyagolása révén tehát alulbecsüljük az enzimkörnyezettől származó extra stabilizációs energiát. A hidrátburok első héjának modellezésénél a lehető legtöbb vízmolekulát vettem figyelembe, ez a stabilizációs energia tulbecsüléséhez vezethet. Ezzel szemben a további héjak hatásának elhanyagolása többé-kevésbé kompenzálja a hibát.

Összefoglalva az alfejezetben leírtakat, megállapítható, hogy az "eltemetett" aszpartátnak meghatározó szerepe van a szerin-proteázok katalitikus hatásának kialakításában. Nem azáltal, hogy protonátmenettel elősegíti az alkoxidion kialakulását az aktív szerin oldalláncon, hanem igen erős elektrosztatikus téreffektusa révén növeli ennek nukleofil erejét, a vizes oldathoz képest stabilizálja az átmeneti terméket. Szinte biztos, hogy nem az elektrosztatikus hatás az egyetlen sebességnövelő tényező a katalízisben, fontossága azonban vitathatatlan. Szerepét akkor lehetne kísérletileg ellenőrizni, ha olyan mesterséges enzim állna rendelkezésre, melyben a katalitikus triád aszpartátját aszparagin helyettesíti.

4.4. Ellenionok szerepe az enzimkatalízisben

Az előző alfejezetekben rámutattam a fehérje elektrosztatikus térnek döntő szerepére a szerin-[']-proteázok által katalizált peptidhidrolízisben. Ha ez a megállapítás valóban helyes, akkor a családhoz tartozó enzimekben az elektrosztatikus térnek is hasonlónak kell lenni a katalitikus triád környezetében. Ezt a problémát tanulmányoztuk az α - és a γ -kimotripszin, a β -tripszin és a szubtilizin esetében /93, 26/.

A X. táblázatban látható a szóbanforgó enzimek primér szerkezete a katalitikus triád környezetében. Az α - és a γ -kimotripszin aminosav-sorrendje azonos, csak a térszerkezet különbözik /50/. A β -tripszinben néhány helyen eltérés van az előző két enzimhez képest (pl. Met-192 \rightarrow Gln-192, Thr-54 \rightarrow Ser-54, Val-60 \rightarrow Lys-60), melyek befolyásolhatják az elektrosztatikus teret. A szubtilizin szekvenciája gyökeresen különbözik a többitől, tisztán szemléletes alapon azt várnánk, hogy az elektrosztatikus tér is lényegesen más lesz.

Meghatároztuk az említett négy enzim elektrosztatikus potenciálját a PROTPOT programmal /19/ a katalitikus triád néhány pontjában. Figyelembe vettük az enzimek valamennyi atomját, kivéve azokat,

X. táblázat. Néhány szerin-proteáz aminosav-szekvenciája a katalitikus triád környezete-
 tében. A felső számozás az α - és γ -kimotripszinre és a β -tripszinre, az alsó a
 szubtilizinre vonatkozik. Az egyezéseket aláhúzás jelöli.

	190	195	200
α - és γ -kimotripszin	<u>Ser-Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Val</u>		
β -tripszin	<u>Ser-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Val-Val</u>		
szubtilizin	Ala-Tyr-Asn-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Ser-Pro-His	220	225

	55	60
α - és γ -kimotripszin	<u>Val-Val-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Gly-Val-Thr-Thr</u>	
β -tripszin	<u>Val-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Tyr-Lys-Ser-Gly</u>	
szubtilizin	Gln-Asp-Asp-Asn-Ser-His-Gly-Thr-His-Val-Ala	60

	100	105
α - és γ -kimotripszin	<u>Leu-Thr-Ile-Asn-Asn-Asp-Ile-Thr-Leu-Leu-Lys</u>	
β -tripszin	<u>Asn-Thr-Leu-Asn-Asn-Asp-Ile-Met-Leu-Ile-Lys</u>	
szubtilizin	Lys-Val-Ala-Val-Ile-Asp-Ser-Gly-Ile-Asp-Ser	30

35

melyek a triádhoz tartoznak. Kétféle modellt tekintettünk, az egyikben valamennyi ionizálható oldallánc (Glu, Asp, Lys, Arg) egységnyi töltést hordoz, a másikon ezeket semlegesnek vettük.

Az eredményeket a XI. táblázatban és a 23. ábrán foglaltam össze. Ha az oldalláncokat ionizálnak

XI. táblázat. A fehérje elektrosztatikus potenciáljának változása a katalitikus triád mentén a szerinproteázokban (kJ/mol).

enzim	O ^γ	A ^a	N ^{ε2}	N ^{δ1}	B ^b	C ^c	E ^d _{tetr}
szubtilizin ^e	-66	-131	-160	-163	-152	-137	41
szubtilizin ^f	205	165	165	200	223	207	-230
α-kimo- tripszin ^e	343	359	399	525	649	592	-473
α-kimo- tripszin ^f	134	71	26	97	121	74	-147
γ-kimo- tripszin ^e	201	218	272	382	469	463	-337
γ-kimo- tripszin ^f	30	-38	-31	29	81	53	-84
β-tripszin ^e	664	609	600	643	704	664	-707
β-tripszin ^f	18	-42	-58	-18	37	-8	-48

^a az O^γ...N^{ε2} szakasz felezőpontja

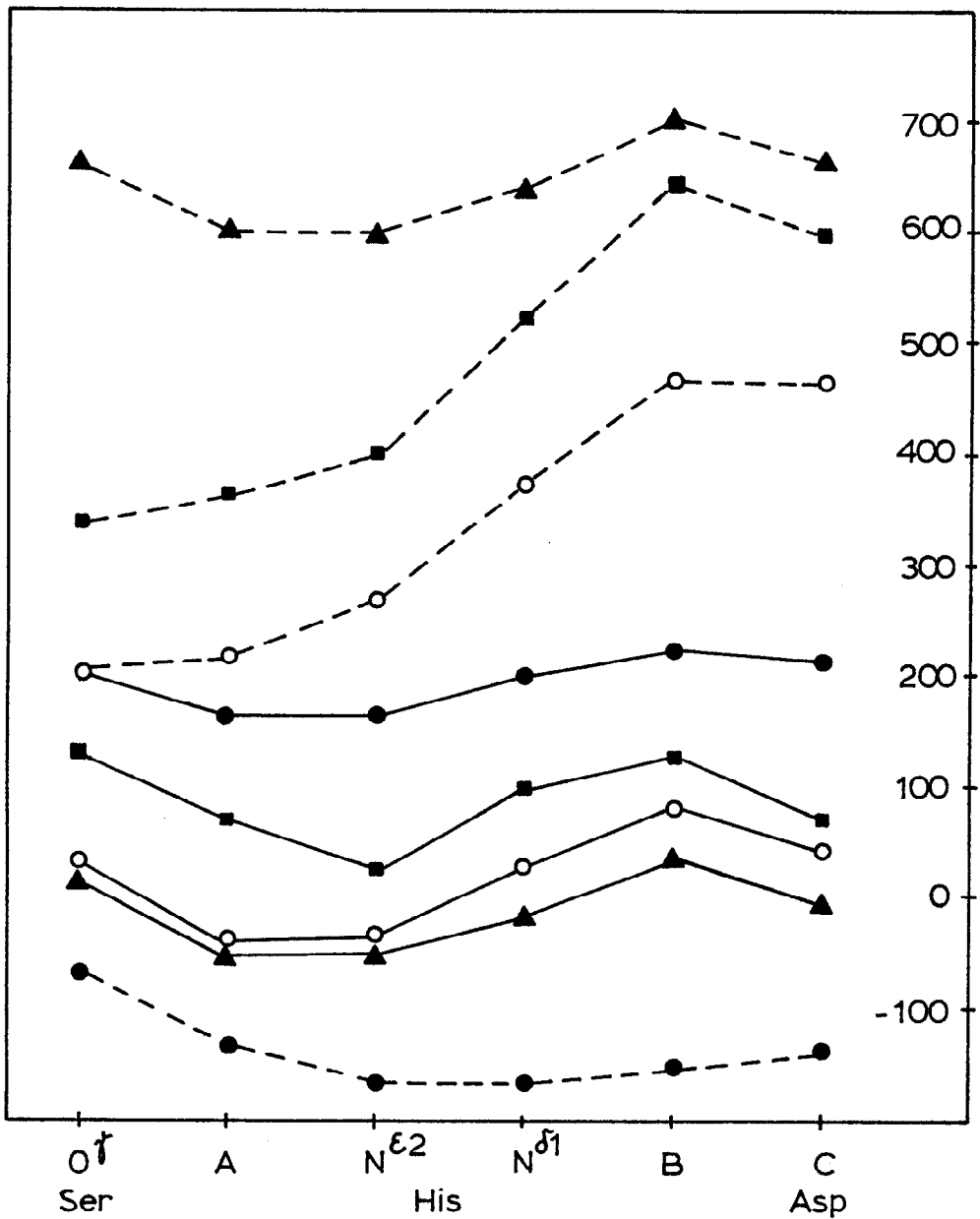
^b az N^{δ1}...C szakasz felezőpontja

^c az O^{δ1}...O^{δ2} szakasz felezőpontja

^d a (-1,+1/2,+1/2,-1) ponttöltésrendszer energiája az enzimefehérje által keltett térben

^e töltött oldalláncok

^f semleges oldalláncok



23. ábra. A fehérje elektrosztatikus potenciáljának a változása a katalitikus triád mentén a subtilizinben (●), az α -kimotripszinben (■), a γ -kimotripszinben (○) és a β -tripszinben (▲). A szaggatott vonal a töltött, a kihuzott vonal a semleges felületi oldalláncoknak felel meg. Az A, B és C pontok definíciója a XI. táblázat feliratában található.

tekintjük, mint Hayes és Kollman /27, 37/, jelentős különbség van az enzimek között, csak az α - és γ -kimotripszin tere hasonló. Alapvetően különbözik az α -kimotripszin és a szubtilizin, az előbbiben a tér kedvez, utóbbiban pedig ellene hat a Ser...His protonátmenetnek, a (- +) töltéseloszlás kialakulásának.

Vizes oldatban a fehérjék felszíni, töltött oldalláncai körül ellenionok helyezkednek el /94, 95/, melyek árnyékolják a töltést. A 23. ábrán látható, hogy az ellenionok hatására alapvetően megváltozik a potenciál és valamennyi enzimben minimuma van a His környezetében. Eszerint a fehérje elektrosztatikus tere mind a négy esetben stabilizálja az átmeneti állapotnak megfelelő (- + -) töltéseloszlást. A XI. táblázat utolsó oszlopában tüntettem fel egy olyan ponttöltés-rendszer környezetétől származó stabilizációs energiáját, melyben egy ségnyi negatív töltés van a szerin O^{γ} -atomján, valamint az aszpartát $O_1^{\delta 1}$ és $O_1^{\delta 2}$ -atomjait összekötő szakasz felezőpontjában, továbbá egyenként +1/2 töltés a hisztidin $N^{\epsilon 2}$ és $N^{\delta 1}$ atomjain. Ha az ellenionokat elhagyjuk, a számértékek jelentősen különböznek, a szubtilizinben még az előjel is megváltozik. Ez azt jelenti, hogy ebben az enzimben a

környezet gátolná a tetraédres intermedier kialakulását. Lényegesen kisebb a szórás akkor, ha az ellenionok árnyékoló hatását figyelembe vesszük. Mind a négy enzimben a környezet stabilizálja a hidrolitikus reakció átmeneti termékét. A 23. ábrából felismerhető a rokonság a szubtilizin és a tripszin-családhoz tartozó enzimek között, mely az aminosav-sorrendből nem tűnik ki.

A fentieket összegezve megállapíthatjuk, hogy az ellenionok fontos szerepet játszanak a szerin-proteázok működésében. A felszíni, töltött oldal-láncok elektrosztatikus terének árnyékolásával befolyásolják az enzimreakció átmeneti termékének stabilitását, tehát a reakció sebességét. Az egymástól aminosav-sorrendben lényegesen különböző szubtilizin és α -kimotripszin elektrosztatikus potenciálja hasonló a katalitikus triád környezetében, de csak akkor, ha az ellenionok hatása is érvényesül. Nem látszik elképzelhetetlennek, hogy a szubtilizin és a tripszin-család enzimei úgy változtak az evolúció során, hogy nemcsak a katalitikus triád jöjjön létre valamennyiben, hanem az elektrosztatikus potenciál is hasonlóan változzék bennük a triád mentén.

Köszönetnyilvánítások

Ezúton mondok köszönetet a CHINOIN kutatási vezetői közül dr. Mészáros Zoltán kutatási igazgatónak és dr. Kovács Gábor főosztályvezetőnek kutatásaim támogatásáért. Hálával tartozom dr. Polgár Lászlónak a szerin-proteázokról folytatott számtalan megbeszélésért és a problémák felvetéséért. Köszönöm kollégáim ötleteit, együttműködését és segítségét a közös kutatásokban. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm közvetlen munkatársaimnak, Ángyán Jánosnak és dr. Surján Péternek a dolgozat témájában folytatott építő vitákat.

Irodalom

1. M.C. Flanigan, A. Komornicki, J.W. McIver, Jr. cikke, Semiempirical Methods of Electronic Structure Calculation, Part B: Applications (szerk.: G.A. Segal), Plenum, New York-London, 1977, 1. old.
2. G. Klopman cikke, Chemical Reactivity and Reaction Paths (szerk.: G. Klopman), Wiley-Interscience, New York-London-Sydney-Toronto, 1974, 55. old.
3. E. Scrocco, J. Tomasi, Fortschr. Chem. Forsch. 42, 95 (1973).
4. E. Scrocco, J. Tomasi, Adv. Quantum Chem. 11, 115 (1978).
5. C. Petrongolo, Gazz. Chim. Ital. 108, 445 (1978).
6. R. Bonaccorsi, E. Scrocco, J. Tomasi, J. Am. Chem. Soc. 98, 4049 (1976); 99, 4545 (1977).
7. A. Agresti, R. Bonaccorsi, J. Tomasi, Theoret. Chim. Acta (Berl.) 53, 215 (1979).
8. A.D. Tait, G.G. Hall, Theoret. Chim. Acta (Berl.) 31, 311 (1973); R. Rein, Adv. Quantum Chem. 7, 335 (1973); A.T. Amos, R.J. Crispin cikke, Theoretical Chemistry, 2. köt. (szerk.: H. Eyring, D. Henderson), Academic Press, New York

- 1976, 2. old.; A. Pullman, G. Perahia, *Theoret. Chim, Acta (Berl.)* 48, 29 (1978).
9. A. Warshel, *Acc. Chem. Res.* 14, 284 (1981).
 10. G. Náray-Szabó, *Acta Phys. Acad. Sci. Hung.* 40, 261 (1976); G. Náray-Szabó cikke, *Proc. Symp. on Quantitative Structure-Activity Analysis* (szerk.: R. Franke, P. Oehme), Akademie-Verlag, Berlin, 1978, 191. old.
 11. G. Náray-Szabó, *Int. J. Quantum Chem.* 16, 265 (1979).
 12. G. Náray-Szabó, A. Grofcsik, K. Kósa, M. Kubinyi, A. Martin, *J. Comput. Chem.* 2, 58 (1981).
 13. C.C.J. Roothaan, *J. Chem. Phys.* 19, 1445 (1951).
 14. G. Náray-Szabó, *Quantum Chemistry Program Exchange* 13, 396 (1980).
 15. J.A. Pople, D.L. Beveridge, *Approximate Molecular Orbital Theory*, McGraw Hill, New York, 1970.
 16. G. Peinel, G. Náray-Szabó, előkészületben.
 17. J.P. Malrieu cikke, *Semiempirical Methods of Electronic Structure Calculation, Part A: Theory* (szerk.: G.A. Segal), Plenum, New York-London, 1977. 69. old.
 18. Náray-Szabó G., *Alkalmazott kvantumkémia*, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1979.

19. Ángyán J., Náray-Szabó G., PROTPOT program, CHINOIN ODRA 1305, Budapest, 1981.
20. F.C. Bernstein, T.F. Koetzle, G.J. Williams, E.F. Mayer, Jr., M.D. Brice, J.R. Rogers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, J. Mol. Biol. 112, 535 (1977).
21. Kapuy E., Török F., Az atomok és molekulák kvantumelmélete, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1975.
22. A. Pullman, Fortschr. Chem. Forsch. 31, 45 (1972).
23. P. Schuster cikke, Intermolecular Interactions: From Diatomics to Biopolymers (szerk.: B. Pullman), Wiley, London-New York-Sydney-Toronto, 1978, 363.old.
24. J. Ángyán, G. Náray-Szabó, Acta Phys. Acad. Sci. Hung. közlésre benyújtva.
25. D.M. Hayes, P.A. Kollman, J. Am. Chem. Soc. 98, 3335 (1976).
26. J. Ángyán, G. Náray-Szabó, J. Am. Chem. Soc. közlésre benyújtva.
27. P.A. Kollman, D.M. Hayes, J. Am. Chem. Soc., 103, 2955 (1981).
28. G. Náray-Szabó, Acta Phys. Acad. Sci. Hung. 51, 65 (1981).
29. H.B. Bürgi, J.M. Lehn, G. Wipff, J. Am. Chem. Soc. 96, 1956 (1974).

30. J. March, *Advanced Organic Chemistry*, 2nd Ed., McGraw Hill, Tokyo, 1977, 20. old.
31. W.F. Reynolds, T.A. Modro, P.G. Mezey, *J.C.S. Perkin Trans. II* 1066 (1977).
32. W.F. Reynolds, P.G. Mezey, G.K. Hamer, *Canad. J. Chem.* 55, 522 (1977).
33. R.D. Topsom, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 39 (1981).
34. K. Ósabay, G. Náray-Szabó, *Tetrahedron*, közlésre benyújtva.
35. P. Pulay, F. Török, *Mol. Phys.* 25, 1153 (1973).
36. J.E. Bartmess, R.T. McIver, Jr., *Gas Phase Ion Chem.* 2, 88 (1979).
37. D.M. Hayes, P.A. Kollman cikke, *Catalysis in Chemistry and Biochemistry: Theory and Experiment* (szerk.: B. Pullman), Reidel, Boston, 1979, 77. old.
38. T.L. Sayer, D.L. Rabenstein, *Canad. J. Chem.* 54, 3392 (1976).
39. J. Seres, G. Náray-Szabó, K. Simon, K. Daróczi-Csuka, I. Szilágyi, L. Párkányi, *Tetrahedron* 37, 1565 (1981).
40. H.B. Bürgi, *Angew. Chem.* 87, 461 (1975).
41. R.E. Rosenfield, Jr., J.D. Dunitz, *Helv. Chim. Acta* 61, 2176 (1978).
42. G. Náray-Szabó, P.R. Surján, *J. Signal AM* 8, 445 (1980).

43. C. Glier, F. Dietz, M. Scholz, G. Fischer, *Tetrahedron* 28, 5779 (1972).
44. T. Tani, *Photogr. Sci. Eng.* 19, 114 (1975).
45. D.L. Smith, H.R. Luss, *Photogr. Sci. Eng.* 20, 184 (1976).
46. A.T. Hutton, H.M.N.H. Irving, K.R. Koch, L. Nassimbeni, G. Gabener, *J.C.S. Chem. Comm.* 57, (1979).
47. G. Náray-Szabó, *Pure Appl. Chem.* 52, 1565 (1980).
48. G. Náray-Szabó, T. Bleha cikke, *Molecular Structure and Conformation: Recent Advances* (szerk.: I.G. Csizmadia), Elsevier, Amsterdam, 1982.
49. Náray-Szabó G., *Magy. Kém. Lapja* 17, 7 (1982).
50. J. Kraut, *Annu. Rev. Biochem.* 46, 331 (1977).
51. J.J. Birktoft, D.M. Blow, *J. Mol. Biol.* 68, 187 (1972).
52. G.H. Cohen, E.W. Silverton, B.W. Matthews, H. Braxton, D.R. Davies, *J. Mol. Biol.* 44, 129 (1969).
53. (a) C.S. Wright, R.A. Alden, J. Kraut, *Nature* 221, 235 (1969); (b) R.A. Alden, J.J. Birktoft, J. Kraut, J.O. Robertus, C.S. Wright, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 45, 337 (1971).

54. H.C. Watson, D.M. Shotton, J.M. Cox, H. Muirhead, Nature 225, 806 (1970).
55. R.M. Stroud, L.M. Kay, R.E. Dickerson, J. Mol. Biol. 83, 185 (1974).
56. P.W. Coddington, L.T.J. Delbaere, K. Hayakawa, W.L.B. Hutcheon, M.N.G. James, L. Jurásek, Can. J. Biochem. 52, 208 (1974).
57. D.M. Blow, J.J. Birktoft, S.S. Hartley, Nature 221, 337 (1969).
58. M.W. Hunkapiller, S.H. Smallcombe, D.R. Whitaker, J.H. Richards, Biochemistry 12, 4732 (1973).
59. D.M. Shotton, H.C. Watson, Nature 225, 811 (1970).
60. L. Polgár, M.L. Bender, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 1335 (1969).
61. W.W. Bachovchin, J.D. Roberts, J. Am. Chem. Soc. 100, 8041 (1978).
62. J.L. Markley, I.B. Ibanez, Biochemistry 17, 4627 (1978).
63. A.A. Kossiakoff, S.A. Spencer, Nature 288, 414 (1980).
64. G.I. Amidon, J. Theor. Biol. 46, 101 (1974).
65. H.P. Kitayama, H. Fukutome, J. Theor. Biol. 60, 1 (1976).

66. Y. Beppu, S. Yomosa, J. Phys. Soc. Jpn. 42,
1694 (1977).
67. S. Scheiner, D.A. Kleier, W.N. Lipscomb, Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 72, 2606 (1975).
68. S. Scheiner, W.N. Lipscomb, Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 73, 432 (1976).
69. S. Nakagawa, H. Umeyama, T. Kudo, Chem. Pharm.
Bull. 28, 1342 (1980).
70. H. Umeyama, S. Nakagawa, T. Kudo, J. Mol. Biol.
150, 409 (1981).
71. H. Umeyama, S. Nakagawa, Chem. Pharm. Bull. 27,
1524 (1979).
72. S. Yomosa, Progr. Theoret. Phys. Suppl. 40, 249
(1967).
73. G. Johannin, N. Kellersohn, Biochem. Biophys.
Res. Commun. 49, 321 (1972).
74. R.P. Sheridan, L.C. Allen, Biophys. Chem. 11,
133 (1980).
75. W.G.J. Hol, P.T. Van Duijnen, H.J.C. Berendsen,
Nature 273, 443 (1978).
76. D.M. Hayes, P.A. Kollman, J. Am. Chem. Soc. 98,
7811 (1976).
77. A. Warshel, M. Levitt, J. Mol. Biol. 103, 227
(1976).

78. P.T. Van Duijnen, B.T. Thole, W.G.J. Hol, *Bio-phys. Chem.* 9, 273 (1979).
79. O. Tapia, C. Lamborelle, G. Johannin, *Chem. Phys. Letters* 72, 334 (1980).
80. R.P. Sheridan, L.C. Allen, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 1544 (1981).
81. G. Náray-Szabó cikke, *Proc. 3th Congr. Hung. Pharm. Soc.: Quantitative Structure-Activity Relationships* (szerk.: F. Darvas), Akadémiai Kiadó, Budapest, 1980, 295. old.
82. G. Náray-Szabó, L. Polgár, *Int. J. Quantum Chem., Symp.* 7, 397 (1980).
83. G. Náray-Szabó, A. Kapur, P.G. Mezey, L. Polgár, *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, közlésre elfogadva.
84. P. Roberts, G. Sheldrick, *Program XANADU*, University of Cambridge, 1976.
85. J. Chandrasekhar, J.G. Andrade, P.v.R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 5609 (1981).
86. P. Čársky, M. Urban, *Ab Initio Calculations. Methods and Applications in Chemistry*, Lecture Notes in Chemistry, 16. köt. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1980.
87. R. Yamdagni, J. Kebarle, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 4050 (1975).
88. L. Polgár, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 7 29 (1972).

89. G. Náráy-Szabó, Int. J. Quantum Chem., Symp. közlésre benyújtva.
90. G. Náráy-Szabó, Int. J. Quantum Chem., közlésre elfogadva.
91. A. Tulinsky, N.V. Mani, C.N. Morimoto, R.L. Vandlen, Acta Cryst. B29, 1309 (1973).
92. O. Tapia cikke, Quantum Theory of Chemical Reactivity (szerk.: R. Daudel, A. Pullman, L. Salem, A. Veillard), 2. köt., Reidel, Dordrecht, 1980, 226. old.
93. G. Náráy-Szabó, J. Ángyán, P.R. Surján cikke Steric Effects in Biomolecules (szerk.: G. Náráy-Szabó), Elsevier-Akadémiai Kiadó, Amsterdam-Budapest, 1982, 191. old.
94. A.N. Glazer cikke, The Proteins, 2. köt. (szerk.: H. Neurath, R.L. Hill), 1976, 1. old.
95. D.C. Rees, J. Mol. Biol. 141, 323 (1980).