



**BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR**

Átmenetifém-tartalmú biológiailag aktív rendszerek reaktivitása

MTA Doktori értekezés

Készítette: Dr. Oláh Julianna
Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék



2021

*Lányaimnak Boginak, Lizának és Lénának
öcsémnek Lacusnak és Attilának
Katának, Zsófinak, Zizinek és Virginek*

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az értekezésem szeretném megköszönni szüleimnek, hogy egész életemben szerettek, tanítottak és támogattak. Édesanyám mindig mellettem állt, és rengeteget segített a COVID-19 vírus okozta nagyon nehéz helyzetben, a gyerekek egésznapos otthoni tanításában, ellátásban és gondozásában, ezért külön is hálás vagyok neki. Köszönöm férjemnek a szeretetet és támogatást, amellyel az ismeretségünk alatt megajándékozott. Nagyon sokat jelentenek nekem a családi kapcsolataim, amelyek keretet adnak az életemnek. Szeretettel gondolok unokahúgaimra és unokaöcsémre, Katára, Pannira, Zsuzsira, Zsófira, Kincsőre, Lackóra, Dárirra és Pannára, keresztyerekeimre Danira, Gittére, Rebire, Zsuzsira valamint bérmagyermekeimre, Gergőre és Eszterre. Latin tanárom, Hadik Béláné, Vali néni és francia tanárom, Révai Anna néni szeretetét soha nem fogom elfelejteni.

Minden témavezetőmnek őszinte hálával tartozom, hogy bevezettek a kvantumkémia rejtjelmeibe és sokat tettek azért, hogy belőlem önálló kutató és témavezető válhasson: mindenekelőtt Veszprémi Tamásnak (BME) és Jeremy Harvey-nak (KULeuven), akik támogatása mind a mai napig fontos nekem, Christian Van Alsenoy-nak (Universiteit Antwerpen) és Paul Geerlings-nek (Vrije Universiteit Brussel). Köszönöm főnökeimnek Hargittai Istvánnak (MTA-TKI) és Nyulászi Lászlónak (BME) a bizalmat, hogy engedték, hogy szabadon dolgozzak és az általuk nyújtott minden támogatást. Nagyon hálás vagyok Bakó Imre tanácsaiért és a gyümölcsöző beszélgetésekért, amellyel nagymértékben hozzájárult, hogy újra otthon érezhessem magam a magyar tudományos életben kétéves angliai tartózkodásom után. Köszönöm Zsombok Györgynek az áldozatos szeretetét, amivel újra és újra összegyűjtötte Veszprémi Tamás világba szétszéledt diákjait, s számunkra élő közösséget teremtett, amely mind a mai napig fontos számomra.

Doktoránsaimnak, Krámos Balázsnak, Krezinger Anikónak, Benedek Zsoltnak, Ahmed Rozzának és Joseph Kfoury-nak nagyon sokat köszönhetek. Bizalmuk, kemény munkájuk, lelkesedésük és mindennapos jelenlétük az életemben örömmé tette a kutatómunkát. Szeretném megköszönni hallgatóimnak, Csiba Farkasnak, Izrael Richárdnak, Nagy Kristófnak, és különösen Papp Marcellnek és Girnt Péternek a közös munkát. Köszönöm azok bizalmát is, akik tanulmányútra jöttek a csoportomba: Laura van Bergennek és Pintér Balázsnak (Vrije Universiteit Brussel, Belgium), valamint Jitrayut Jitonnomnak és Wijitra Meeluának (University of Phayao, Thaiföld). Hálás vagyok mindazon kollégáknak, akikkel együtt dolgozhattam angliai tartózkodásom után. Köszönöm Szilvási Tibornak és Hollóczki Oldamurnak a stimuláló beszélgetéseket és Benkő Zoltán minden segítségét, akivel nagyon jó együtt gondolkodni és tanítani. Hálás vagyok kollégámból lett barátaimnak Frank Blockhuysnek, Mátrai Jankának és Goedele Roosnak. Kádasné dr. Hazadi Éva Katalin, Hargittai Magdolna, Karancsiné Menyhárd Dóra, Kazinczyné Vas Mária és Vértessy G. Beáta a legfontosabb példaképeim, akiktől nagyon sokat tanultam életről és munkáról is.

Gondolataimat azokkal szeretném zárni, akik nélkül ez a dolgozat biztosan nem készült volna el. Köszönöm az MTA Bolyai János Kutatási és KGYNK (14 év alatti gyermeket nevelő kutatónők, valamint kiskorú gyermeket egyedül nevelő kutatók számára) ösztöndíjait. Az anyagi támogatás, valamint az utóbbihoz kapcsolódó ígéretem nagyon fontos hajtóerő volt az értekezés megírásában. Nagyon nehéz időszakot éltem át a KGYNK ösztöndíj kezdete óta, s őszinte és mély hálával tartozom Kálmos Évának, Sólyom Beátának és Szláby Tibornak minden támogatásukért; nélkülük nem lettem volna képes megírni a disszertációt. Az MTA Doktori pályázat beadásának adminisztratív ügyei kapcsán sok tanácsot és segítséget kaptam Király Nórától és Andódy Katalintól. Köszönöm mindenkinek, aki átolvasta az értekezés vagy a tézisfüzetem egészét vagy egy részét: Bakó Imrének, Mátrai Jankának, Nyulászi Lászlónak, Olasz Andrásnak és Veszprémi Tamásnak. Hálás vagyok mindenkinek, aki gondolataival és imáival, legyen akár keresztény akár muszlim, segített abban, hogy ez a disszertáció elkészüljön.

Tartalom

1.	Bevezetés.....	9
2.	Alkalmazott módszerek.....	11
2.1.	Sűrűségfunkcionál-elméleten alapuló számítások alkalmazása átmenetifém-komplexek esetén 11	
2.2.	QM/MM számítások.....	15
3.	Citokróm P450 enzimek vizsgálata.....	22
3.1.	CYP enzimek aktív formájának (Compound I) reaktivitása [D1].....	24
3.2.	CYP enzim által katalizált gyógyszermetabolizmus régiószelektivitását befolyásoló tényezők vizsgálata [D2].....	32
3.3.	Ösztrogének metabolizmusának régiószelektivitása [D3].....	38
3.4.	A humán aromataáz (P450arom)enzimreakciómechanizmusának felderítése [D4-D5]	45
4.	Gázmolekulák kölcsönhatása a hemcsoporttal.....	49
4.1.	Nitrogén-monoxid kötődési energiájának meghatározása a hem-csoporthoz DFT és magasszintű <i>ab initio</i> számítások segítségével [D6].....	49
4.2.	A P450 _{nor} enzim által katalizált reakció mechanizmusa [D7]	58
4.3.	Mioglobín és gázmolekulák reakciója [D8]	60
4.4.	Ligandum diffúzió H-NOX fehérjékbe [D9].....	64
5.	Izopropil-malát dehidrogenáz (IPMDH) enzim	75
5.1.	Az IPMDH enzim által katalizált reakció mechanizmusa [D10]	77
5.2.	A káliumion szerepe a IMPDH enzim katalitikus aktivitásában [D11]	79
5.3.	További mutációk hatása az IMPDH enzim reaktivitására [D12].....	81
6.	Biomimetikus rendszerek vizsgálata.....	88
6.1.	Biomimetikus nitrogénfixáció szabadentalpia-profilja [D13].....	91
6.2.	Képesek-e a biomimetikus nitrogénfixáció intermedierjei egymással reagálni? [D14]	95 -
6.3.	Az autokatalitikus <i>HER</i> hipotézis [D15]	98 -
7.	Összefoglalás és kitekintés.....	111
8.	Dolgozat témájához kapcsolódó PhD értekezések.....	113
9.	Dolgozat alapjául szolgáló közlemények.....	113
10.	PhD fokozat megszerzése után megjelent közlemények, amelyek nem képezik a dolgozat tárgyát.....	114
11.	PhD fokozat megszerzése előtt megjelent közlemények	116
12.	Irodalomjegyzék.....	118

Gyakran használt rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Angol kifejezés	Magyar kifejezés
ADR	adverse drug reaction	káros gyógyszerhatás
aHER	autocatalytic hydrogen evolution reaction	autokatalitikus hidrogénfejlődési reakció
ASD	androstenedione	androszténdion
BDE	bond dissociation energy	kötésszociációs energia
BDFE	bond dissociation free energy	kötésszociációs szabadentalpia
BS DFT	broken symmetry DFT	törtaszimmetriájú DFT
BSSE	basis set superposition error	báziskészlet szuperpozíciós hiba
CO	carbon monoxide	szén-monoxid
Cpd I	compound I	compound I
CYP vagy P450	cytochrome P450 enzyme	citokróm P450 enzim
Cs vagy Tt	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> vagy <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> (ugyanaz az organizmus)	
DFT	density functional theory	sűrűség funkcionál elmélet
DZ	double-zeta	kétszeres-zéta
EP3/EPPP	triphosphino-borane/carbonyl/silyl ligand synthesized by J. Peters et al	trifoszfino-borán/karbonil/szilil ligandum
ET	electron transfer	elektrontranszfer
GGA	generalized gradient approximations	általánosított gradiens közelítés
HAT	hydrogen atom transfer	hidrogénatom-transzfer
HER	hydrogen evolution reaction	hidrogénfejlődési reakció
HF	Hartree-Fock	Hartree-Fock
H-NOX	heme/nitric oxide oxygen binding domain	hem/nitrogén-monoxid-O ₂ kötő domén
HRT	hormon replacement therapy	Hormonpótló terápia
IPM	isopropyl-malate	izopropil-malát
IPMDH	isopropyl-malate dehydrogenase	izopropil-malát dehidrogenáz

<i>Ka</i>	<i>Kordia algicida</i>	<i>Kordia algicida</i>
kcat	catalytic constant	katalitikus konstans: adott enzimkoncentráció mellett egységnyi idő alatt átalakított szubsztrát molekulák számát adja meg
KS	Kohn-Sham	Kohn-Sham
LDA	local-density approximation	lokális sűrűség közelítés
MD	molecular dynamics	molekuladinamika
MM	molecular mechanics	molekulamechanika
N2RR	nitrogen (N ₂) reduction reaction	nitrogénredukciós reakció
NO	nitric oxide	nitrogén-monoxid
<i>Ns</i>	<i>Nostoc sp.</i>	<i>Nostoc sp.</i>
P450nor	P450 nitric oxide reductase	P450 nitrogén-monoxid reduktáz
P450arom	human aromatase	humán aromatóz
PCET	proton coupled electron transfer	protonkapcsolt elektrontranszfer
PES	potential energy hyper-surface	potenciális energia hiperfelület
PT	proton transfer	protontranszfer
QM	quantum mechanics	kvantummechanikai/kvantumkémiái
QM/MM	combined quantum mechanics molecular mechanics	kombinált kvantumkémiái és molekulamechanikai számítások
QZ	quadruple-zeta	négyszeres- zéta
RKS	restricted KS	megkötéses KS
RMSD	root mean square deviation	átlagos négyzetes eltérés négyzetgyöke
RMSF	root mean square fluctuation	átlagos négyzetes fluktuáció négyzetgyök
ROKS	restricted Open Shell KS	megkötéses nyílthéjú KS
ROS	reactive oxygen species	reaktív oxigén gyök
sGC	soluble guanylyl cyclase	vízoldható guanilil cikláz
TOF	turnover frequency	átviteli frekvencia
TON	turnover number	átviteli szám
TZ	triple zeta	háromszoros-zéta
UKS	unrestricted KS	megkötések nélküli KS
WT	wild type	vad típus

Legfontosabb aminosavak és a használatban lévő egybetűs és hárombetűs rövidítései

	és	Teljes név
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cisztein
D	Asp	Aszparaginsav
E	Glu	Glutaminsav
F	Phe	Fenil-alanin
G	Gly	Glicin
H	His	Hisztidin
I	Ile	Izoleucin
K	Lys	Lizin
L	Leu	Leucin
M	Met	Metionin
N	Asn	Aszparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Szerin
T	Thr	Treonin
V	Val	Valin
W	Trp	Triptofán
Y	Tyr	Tirozin

1. Bevezetés

Az embert ősidők óta foglalkoztatja, hogy milyen a környezete, miért olyan, amilyen, és hogyan hozhatna létre benne számára kedvező változásokat. A környezetünk alakítása, új eszközök létrehozásának igénye életre hívta a természettudományokat és azokat a alapvető elveket, amelyeken a modern mérnöki tudományok is nyugszanak. A számításon kémia fejlődése jól beleillik ebbe a képbe. Közel száz éve ismerjük a Schrödinger-egyenletet, s hogy annak megoldása részletes információt szolgáltat bármely kvantumrendszer tulajdonságairól. Mégis jelentős elméleti és technikai fejlődésre volt szükség ahhoz, hogy a Schrödinger-egyenletet valós rendszerek esetén legalább közelítőleg megoldhassuk. A rendszerek mérete még napjainkban is korlátozza a Schrödinger-egyenleten alapuló vizsgálatokat, így sokszáz atomos rendszerek esetén továbbra sem alkalmazhatóak könnyedén. Ugyanakkor a legtöbb biológiailag releváns rendszer mérete messze meghaladja a többszáz atomot. Az orvostudomány a gyógyszeripar fejlődése nagy hajtóerőt adott azoknak a számításon kémiai módszereknek a fejlesztéséhez, amelyekkel akár többszázezer atomos rendszereket is vizsgálhatunk. Ezek alkalmasak például biopolimerek tulajdonságainak vizsgálatára, de az elektronszerkezet változásait már nem képesek figyelembe venni, pedig az minden kémiai folyamatnak az alapja. Éppen ezért, ezek a kvantumkémiai és molekulamechanikát kombináló QM/MM számításon módszerek, kiváló lehetőséget kínálnak enzimek reaktivitásának vizsgálatára: lehetővé teszik, hogy az enzim katalizált reakciókat ne egy, az enzimből tetszőlegesen kiválasztott kis modellben, hanem valós fehérjekörnyezetben vizsgáljuk, és tanulmányozhassuk a egész enzim és a környezet szerepét is a katalízisben.

1998-ben kezdtem el kvantumkémiai foglalkozni Prof. Veszprémi Tamás témavezetésével első éves egyetemi hallgatóként. PhD értekezésemet hipovalens szilícium vegyületek reaktivitásáról készítettem, de egyre jobban érdekelt a biológiai rendszerek viselkedése, s a számításon kémia lehetséges ipari alkalmazása. A Richter Gedeon NyRT-nél homológiamodellezéssel, dokkolással és QSAR (kvantitatív szerkezet-hatás összefüggés) modellekkel foglalkoztam, majd egy Marie Curie EIF (Intra-European Fellowship) ösztöndíj keretén belül a Bristol Egyetemen citokróom P450 enzimeket modelleztem. Itt sajátítottam el azokat a számításon kémiai eszközöket, mint a molekuladinamikai számítások, kismolekulák paraméterezése, vastartalmú rendszerek modellezése, valamint kombinált kvantumkémiai és molekulamechanikai számítások (QM/MM, melyeket mind a mai napig aktívan alkalmazunk a csoportomban).

Eddigi tudományos eredményein alapján meg vagyok győződve arról, hogy a számítási kémia szoros kapcsolatban kell, hogy álljon a kísérleti eredményekkel. Éppen ezért számos közös projektben vettem részt az elmúlt évtizedben mind fehérjéket kutató szakemberekkel, mind vaskomplexeket vizsgáló csoportokkal. A fehérje modellezés terén Prof. Vértessy Beátával (BME, TTK) a foszfokolin-citidilil transzferáz enzim szerkezetét vizsgáltuk[S11,S12], míg Prof. Kazinczyné Vas Máriával (TTK) az izopropil-malát dehidrogenáz enzim reaktivitásával foglalkoztunk. Prof. Ivana Ivanović-Burmazović-csal (University of Erlangen) Fe(II)- és Fe(III)-porfirin komplexek és szuperoxid gyökanyon reaktivitásával kapcsolatos problémákat derítettük fel[S6,S7]. Prof. Yann Garcia (Université Catholique de Louvain) spin váltó (spin crossover, SCO) vegyületek szintézisével foglalkozik, s ezek elektronszerkezetét szeretnénk értelmezni, és a spinváltó hajlamuk okát megmagyarázni[S21].

Doktori értekezésemben azokat a munkáimat mutatom be, amelyekben az átmeneti fémionok szerepét vizsgálom kollégáimmal biológiailag releváns rendszerekben. Mivel a dolgozatban felhasznált módszerek jól ismertek, és gyakran használtak, így a rövid metodológiai szekciót az eredmények tárgyalása követi, amely négy fő témakört ölel fel: (1) citokróm P450 enzimek (2) gázmolekulák kölcsönhatása hemcsoporttal (3) izopropil-malát dehidrogenáz enzim (4) biomimetikus nitrogénfixáció. A fejezetek viszonylag eltérő témája miatt célszerűnek tűnt, hogy ne egy nagyobb irodalmi áttekintést tartalmazzon a dolgozat, hanem minden egyes témakör külön-külön bevezetéssel kezdődjön. A dolgozatot összefoglalás és kitekintés zárja.

2. Alkalmazott módszerek

A kutatómunka elsősorban kérdéseket jelent, amelyek esetében legtöbbször a vizsgált rendszer reaktivitásához, a lejátszódó reakciók mechanizmusának feltérképezéséhez kapcsolódnak. Megválaszolásukhoz minden esetben fel kell derítenünk a potenciális energia (szabadentalpia) hiperfelület (PES) lényeges pontjait (reaktánsok, átmeneti állapotok, köztitermékek, termékek), hogy megbízható következtetéseket vonhassunk le.

A rendszer méretétől és a tanulmányozandó problémától függően mind kvantumkémiai, mind hibrid kvantum mechanikai molekulamechanikai (QM/MM) számításokat felhasználtunk az értekezésben bemutatott tanulmányokban. Más esetekben molekulamechanikai erőteret használó molekulára dinamikai (MD) szimulációkat és dokkolási módszereket alkalmaztunk. Mivel ezek a módszerek az irodalomban jól ismertek, ezért ebben a fejezetben csak két kérdéssel foglalkozom. Egyrészt áttekintem a DFT módszerek alkalmazásának kihívásait átmenetifém-komplexek esetén, s a felmerülő nehézségeket. Másrészt bemutatom az enzimek modellezésére általunk használt QM/MM eljárást és a megfontolandó szempontokat. Ennek oka, hogy a QM/MM számítások sokkal kevésbé elterjedtek az MM illetve DFT módszereknél, másrészt nincsen univerzálisan elfogadott protokoll az alkalmazásukra.

2.1. Sűrűségfunkcionál-elméleten alapuló számítások alkalmazása átmenetifém-komplexek esetén

A DFT-n alapuló számítások központi szerepet játszanak az átmenetifém-vegyületek modellezésében. A datív kötések tulajdonságai és a koordinációs vegyületek (elektron)szerkezete a kvantumkémia és a kísérleti módszerek fontos kihívásai közé tartoznak. A molekulapálya-elmélet hatására alakult ki a kristálytér elméletből a ligandum tér elmélet, de csak a DFT módszerek elterjedésével vált lehetővé az átmenetifém-komplexek széleskörű kvantumkémiai modellezése.¹ Segítségükkel betekintést nyerhetünk a koordinációs vegyületek különleges elektronszerkezetébe, spektrális és mágneses tulajdonságaiba és katalitikus aktivitásukba is.

Felmerül ugyanakkor a kérdés, hogy vajon mennyire megbízhatóak átmenetifém-komplexek esetén a DFT-n alapuló módszerek, hiszen a legtöbb DFT funkcionál megbízhatóságát ellenőrző tanulmány (benchmark study) szinte kizárólag főcsoportbeli elemekből álló vegyületeket tartalmazott.² Számos oka van annak, hogy nincs igazán sok átmenetifém-vegyületet tartalmazó ellenőrző tanulmány a DFT funkcionálok pontosságának tesztelésére. Szerepet játszik (1) ezen vegyületek viszonylag nagyobb mérete, (2) a

főcsoportbeli elemeket tartalmazó vegyületekhez képes bonyolultabb elektronszerkezete, (3) a Kohn-Sham egyenletek megoldása során felmerülő konvergencia-problémák (4) a relativisztikus hatások (mind a skaláris, mind a spin-pálya csatolás) jelentőssé válhatnak, amelyet nem mindig könnyű megbízhatóan figyelembe venni. A kísérleti oldalon pedig viszonylag kevés a rendelkezésre álló jó minőségű gáz-fázisú szerkezeti és termokémiai adat, kondenzált fázisokban pedig az oldószer hatások is befolyásolhatják a mért eredményeket.³ Ennek ellenére néhány tanulmány kisebb mintahalmazon részletekbe menően vizsgálja a DFT számítások megbízhatóságát. Lehetőség van magasszintű, egy-^{4,5} vagy többdeterminánsos⁶ csatolt-klaszter módszerekkel, vagy jelentős multireferenciás karakterrel rendelkező rendszerek esetén, CASSCF/CASPT2^{7,8} vagy RASSCF/RASPT2^{9,10} módszerek segítségével validálni a DFT módszereket.

Noha számos nehézség adódik átmenetifém-komplexek esetén a DFT módszerek validálásában, mégis egyre növekvő számú tudományos közlemény jelzi, hogy a DFT módszerek sok esetben szolgáltatnak a kutatók számára értékes és értelmezhető eredményt mind a (bio)szervetlenkémia, mind a fémorganikus kémia területén.¹¹⁻¹³ Elterjedésük kulcsa abban keresendő, hogy képesek a statikus és a dinamikus korrelációs energia részleges figyelembevételére,¹⁴ így a Hartree-Fock módszerhez képes alig megnövekedett erőforrás és idő befektetése mellett adnak megbízhatóbb eredményeket. Fontos azonban tudatában lennünk, hogy átmenetifém-komplexek esetén az energia jellegű mennyiségek hibája valamivel nagyobb lehet, mint főcsoportbeli elemeket tartalmazó vegyületek (kb, 3-5 kcal/mol) esetén, 10 kcal/mol-t meghaladó hibák is könnyedén előfordulhatnak.¹⁵ Ennek oka a fém-ligandum kötésekben rejlő változatosság és multireferenciás jelleg, amely együtt jár a statikus korrelációs energia mennyiségének változásával, s ez befolyásolhatja a számított eredmények megbízhatóságát.

Az átmenetifém-komplexek elméleti vizsgálata során az egyik leggyakrabban megjelenő probléma a spin-állapotok felhasadásának leírása. Ennek oka, hogy a legtöbb DFT funkcionál nem tudja pontosan leírni az elektronok párképzéséhez kapcsolódó energiaváltozást. Mostanra egyértelműnek tűnik az irodalomból, hogy az LDA (local density approximation) és a tiszta GGA funkcionálok drasztikusan túlstabilizálják a komplexek kisspinű formáját, míg a hibrid funkcionálokban, a HF kicserélődési funkcionál mennyiségének növelése egyértelműen a nagyspinű formák stabilizálásához vezet, ~~de komplextől függően változik az ideális érték.~~¹⁶ Noha a standard B3LYP funkcionálban a HF kicserélődési funkcionál hozzájárulása a teljes kicserélődési funkcionálhoz 20%, sokan próbálkoztak ennek megváltoztatásával, s számos esetben a B3LYP*, amely csak 15%-os hozzájárulást tartalmaz, adódott pontosabbnak.^{14,17} Más

esetekben viszont a 40-50%-os HF kicserélődési funkcionál hozzájárulásra is szüksége lehet a spin-felhasadási energia pontos a kísérletekkel, vagy magasabb szintű számításokkal megegyező meghatározásához.¹⁸

A kicserélődési járulék helyes megválasztásán túl, a legtöbb általam használt funkcionál diszperziós korrekcióra szorul (E_{diszp}), amelyet legtöbbször az atommagok elhelyezkedésében számíthatunk egy empirikus formulával, és értékét a teljes energiához adjuk.¹⁹⁻²¹ A ma legelterjedtebb diszperziókorrekciót, Grimme és munkatársai dolgozták ki²² amely alakjában a klasszikus Lennard-Jones potenciált²³ követi:

$$E_{diszp} = - \sum_{n=6,8,10,\dots} \sum_{IJ \text{ atommag-pár}} s_n \frac{C_n^{IJ}(CN^I, CN^J)}{R_{IJ}^n} f_{damp,n}(R_{IJ}) \quad (1)$$

ahol az s_n paraméterek az alkalmazott DFT-funkcionáltól függő skálafaktorok, R_{AB} a két éppen kiválasztott atommag (I és J) közti távolság, C_n^{AB} pedig az IJ atompárhoz tartozó univerzális (DFT-funkcionáltól független) diszperziós koefficiens, melyet kísérleti adatokhoz való illesztéssel határoztak meg minden lehetséges kémiai elem-párosra. Az újabb modellekben C_n^{AB} már nemcsak „I” és „J” rendszámától, hanem a molekulán belüli koordinációs számtól (CN) is függ, Azért, hogy kis atomtávolságok esetén ne vezessen jelentős hibához a diszperziós korrekciónak ez az egyszerű módja, csillapítófüggvényeket használhatunk, többek között az ún. zero csillapítást²⁴ vagy a Becke-Johnson csillapítást.²¹

Nehezebb elemek, és így átmeneti fémek, s főként a nehezebb átmenetifémek esetén a relativisztikus hatások (mind a spin független (skaláris) és spinfüggő) jelentőssé válhatnak.^{25,26} A skaláris relativisztikus hatásokat leggyakrabban pszeudopotenciálok (pl. LANL2DZ, SDD), vagy módosított Hamilton-operátorok segítségével szokták figyelembe venni. Az irodalomban a legelterjedtebb módszerek a ZORA (zeroth order regular approximation) és a Douglas-Kroll-Hess²⁷ (DKH) Hamilton operátorok.

Spinpályákat alapvetően a Dirac egyenletből számíthatunk, de ennek megoldása valós rendszerekre gyakorlatilag lehetetlen. A nemrelativisztikus Hamilton-operátor esetén nincs csatolás a spin és a pálya között, és a különböző spinállapotokat leíró potenciális energia hiperfelületek egymástól függetlenek (diabatikusak). Ebben a képben a spinek átfordulása tiltott, noha tudjuk, hogy a valóságban mégis lejátszódik. A nemadiabatikus átmeneti elméletben, amely segítségével reakciósebességi együtthatókat számíthatunk spin-tiltott reakciókra a felületek közti átugrás valószínűségét a spin-pálya csatolási állandó segítségével

vesszük figyelembe.^{28–30} Ez utóbbi értékét általában valamilyen multireferenciás számítás segítségével (pl. MRCI, CASSCF/CASPT2) szokták meghatározni.³¹

Ahogy fentebb említettem a Kohn-Sham egyenletek konvergenciája is gondot okozhat nyílt héjú átmeneti-fém komplexek esetén, sőt előfordul, hogy nem az alapállapotnak megfelelő rendszer elektronsűrűségét kapjuk meg. Ez könnyen adódhat abból, hogy a d pályák betöltöttsége többféle lehet, pl. Fe(II)-rendszerek esetén kvintett állapotban formálisan van egy kétszeresen és négy egyszeresen betöltött d pálya, viszont apriori nem mindig egyértelmű, hogy melyik d pálya kétszeresen betöltött. Ha felmerül kétség, hogy helyes-e a kapott megoldás, akkor a pályák vizuális vizsgálata után, a betöltöttségi számok manipulálásával, vagy a megoldás stabilitásának vizsgálatával juthatunk el a helyes megoldáshoz.

Szintén felmerül a biradikális rendszereknek a problémája, pl. nyílt héjú szingulett rendszerekben, amelyekben két külön centrumon található egy-egy párosítatlan elektron ellentétes spinnel. Hasonló helyzet fennállhat magasabb spinű rendszerek esetén is, ahol van olyan betöltött β molekulapálya, amely nincs betöltve az α pályakészletben. Ezeknek a leírásához többdeterminánsos módszerekre lenne szükség, ugyanakkor a tört szimmetriájú DFT (broken symmetry DFT, BS DFT³²) is sok esetben értékes eredményeket szolgáltat, pl. sikeresen használták a CYP enzimek aktív ágensének a dublett állapotú formájának modellezésére.^{33,34} vagy a nitrogénáz enzim lehetséges elektronállapotainak vizsgálatára.³⁵ Fontos tudni, hogy törtszimmetriájú megoldások esetén a Kohn-Sham pályákból konstruált Slater determináns esetén a $\langle S^2 \rangle$ operátor várható értéke jóval nagyobb, mint az állapot multiplicitása alapján várhatnánk, és a következő formulával számíthatjuk ki:

$$\langle S^2 \rangle_{UHF/UKS} = \left(\frac{N_\alpha - N_\beta}{2} \right) \left(\frac{N_\alpha - N_\beta}{2} + 1 \right) + N_\beta - \sum_{i,j}^{\text{betöltött}} |\langle \psi_i^\alpha | \psi_j^\beta \rangle|^2 \quad (2)$$

ahol N_α és N_β az elektronok száma a az α és β molekulapályákon, $|\langle \psi_i^\alpha | \psi_j^\beta \rangle|^2$ az átfedési integrál az i-edig α és a j-edik β pálya között. Ha a betöltött β pályák megegyeznek a betöltött α pályák egy alcsoportjával, akkor az átfedési integrál értéke éppen megegyezik N_β -val, s az $\langle S^2 \rangle$ várható értéke is a pontos várható értékkel (az egyenlet első tagja). Minden egyéb esetben a számított $\langle S^2 \rangle$ érték magasabb a pontos értéknél, s ez BS DFT esetén kifejezetten magas spinszennyezéshez vezet. Pl. egy zárthéjú szingulett rendszer esetén az $\langle S^2 \rangle$ értéke 0, míg egy nyílt héjú szingulett biradikális rendszer esetén a $\langle S^2 \rangle_{UHF/UKS}$ értéke 1-nek fog adódni.

A fenti gondolatok jelzik, a nyílthéjú átmenetifém-komplexek modellezésének nehézségeit. Ezért mindig érdemes a DFT módszerekkel végzett számításokat kísérleti

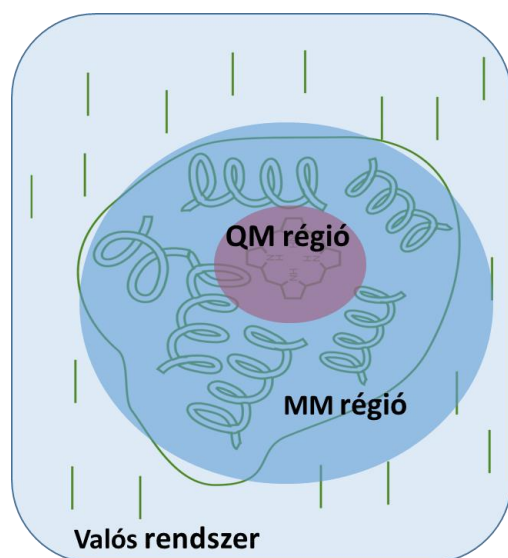
eredményekkel egybevetni, vagy magasabb szintű módszerekhez képest validálni, vagy ha egyik sem lehetséges, akkor legalább többféle DFT funkcionált felhasználni a munka során, s azok összhangjából levonni a következtetéseinket, hogy elkerüljük a számítások bizonytalanságából adódó helytelen interpretációkat.

2.2. QM/MM számítások

Az enzimreakciók elméleti kémiai modellezésére alapvetően háromféle megközelítés áll jelenleg rendelkezésünkre. Az empirikus vegyértékkötés módszerben (empirical valence bond, EVB) a reakciót először egy referencia rendszerben (pl. vizes oldatban) modellezzük, és a paramétereket vagy kísérleti vagy magas szintű számítások eredményeihez illesztjük. Miután ez megtörtént a reakció magában az enzimben is modellezhető.³⁶⁻³⁸ A klasztermódszerben az enzim egy gondosan kiválasztott részletét modellezzük kvantumkémiai, általában DFT módszerekkel, míg a fehérje többi részét homogén médiumként (például implicit oldószermodell segítségével) vesszük figyelembe.³⁹⁻⁴³

A klasztermodellek mellett a QM/MM módszerek a leggyakrabban használtak enzimreakciók elméleti vizsgálatában.⁴⁴⁻⁴⁹ Lehetővé teszik, hogy az egész enzimkörnyezetet (az oldószerburokkal együtt) figyelembe vegyünk a számításaink során. A rendszert két részre osztjuk: a fehérje aktív helyét, ahol a kémiai reakció közvetlenül lejátsszódik, kötések bomlanak fel és/vagy alakulnak ki kvantummechanikai (*ab initio* vagy leggyakrabban DFT) módszerrel írjuk le (QM régió), míg a fehérjét és a környezet (pl. oldószer esetleg ionok) többi részét molekulamechanikai (MM) módszerrel vesszük figyelembe (1. ábra).

A QM/MM számításoknál számos szempontot kell figyelembe vennünk. (1) kiindulási kristályszerkezet kiválasztása és annak előkészítése a számításokhoz (2) fehérje konformációs terének feltérképezése (3) QM régió és MM régió modellezésére használt módszerek kiválasztása és összekapcsolása (4) QM régió atomjainak kiválasztása, QM és MM régió összekapcsolása (5) reakciókoordináta kiválasztása (6) annak eldöntése, hogy energia vagy szabadentalpia jellegű mennyiséget szeretnénk meghatározni. Mivel nagyon sokféle protokoll létezik az irodalomban, az általunk használt módszert mutatom be csak részletesebben.



Fehérje modellezésre használt protokoll

1. Kiindulási szerkezet: PDB adatbankból
2. Fehérje szerkezet kritikus vizsgálata
3. Savas/bázikus oldalláncok protonáltságának meghatározása
4. Ligandum paraméterezése (szükség esetén)
5. Ligandum dokkolása (szükség esetén)
6. Rendszer szolvatációja
7. A rendszer szerkezetének MM optimalizációja
8. MD szimuláció
9. Szerkezetek kiválasztása a trajektóriából QM/MM számításokhoz
10. QM régió kiválasztása
11. Reakciókoordináta kiválasztása
12. QM/MM energiaprofilok felvétele

1. ábra QM/MM számítások lényegének sematikus ábrázolása, és a QM/MM számításokhoz használt protokollunk

(1) Kiindulási kristályszerkezet kiválasztása és annak előkészítése a számításokhoz

QM/MM számítások esetén szinte mindig diffrakciós (röntgen ill. (kis aminosavszerű fehérjék esetén neutron-diffrakcióval) kísérletekből származó szerkezetet használunk kiindulási szerkezetként, noha bizonyos esetekben lehetőség van homológiamodellre [S13], vagy esetleg NMR-rel meghatározott szerkezetek használatára is. Amennyiben több röntgen-diffrakciós szerkezet áll rendelkezésre a tanulmányozandó fehérjéről, érdemes olyat választani, amelyben az atomok helyzete a legnagyobb pontossággal van meghatározva (alacsony az R-faktora ($R < 2\text{Å}$)), vagy olyat, amelyet együtt kristályosítottak valamilyen inhibitorral vagy szubsztrát-analóggal. Mivel a fehérjekristályosítás meglehetősen bonyolult kísérleti feladat, gyakran előfordul, hogy a folyamat elősegítésére a célfehérjék meghatározott aminosavjainak megváltoztatásával ún. mutánsokat hoznak létre. Számításaink kezdetén fontos, hogy az érintett oldalláncokat *in silico* „visszautáljuk”, vagyis helyreállítsuk a fehérje természetben létező „vad” típusának helyes aminosavsorrendjét. (Egy gén vad típusú változatának vagy a természetben előforduló leggyakoribb allél, vagy a laboratóriumban tenyésztett törzs allélját tekintjük.) Az is előfordul, hogy a jó kristályosíthatóság érdekében a fehérjéből hurkokat, rendezetlen vagy egyéb kristályosítást gátló régiót kivágnak. Ezek szükség esetén modellezhetők, és a fehérjeszerkezetbe visszaépíthetők.

Mivel a röntgen-diffrakciós szerkezetek, a módszer tulajdonságaiból adódóan nem tartalmaznak hidrogénatomokat, ezeket hozzá kell adni a kristályszerkezethez pl. egy MM erőter segítségével. Fontos ugyanakkor alaposan megvizsgálni a savas (glutaminsav,

aszparaginsav), bázikus (arginin, lizin és hisztidin), valamint tirozin és cisztein aminosavak oldalláncainak protonáltsági állapotát, hiszen ez a fehérjekörnyezettől függően változhat. Amíg a fehérje felszínén lévő savas oldalláncok általában deprotonált formában fordulnak elő, addig egy apoláros zsebben található savas oldallánc lehetséges, hogy semleges formában van jelen. Ennek eldöntésében a PROPKA^{50,51} vagy H⁺⁺⁵²⁻⁵⁵ algoritmusokat használják elterjedten, amelyek gyors becslést adnak az ionizálható oldalláncok várható pKa értékére.

A legtöbb tanulmányunk során kézzel vagy dokkoló program (Autodock Vina)⁵⁶ segítségével helyeztük el a ligandumot az aktív helyen. A további számításainkhoz szükségünk volt a ligandumok CHARMM27⁵⁷ erőterrel kompatibilis topológiájának, atomtípusainak, kötő és nemkötő paramétereinek ismeretére, amelyeket eleinte kézzel, hasonlósági elven határoztunk meg. Tanulmányoztuk az erőterek atomtípusait és a megfelelő erőállandókat (kötési paraméterek: kötés, kötésszög, diéderes szög, valamint az atomtípusokra jellemző töltés és Lennard-Jones paraméterek), majd a későbbiekben kihasználtuk a CHARMM általános erőter (CGENFF)⁵⁸ nyújtotta lehetőséget a vegyületek parametrizálására.

A fehérjék megfelelő működéséhez elengedhetetlen a megfelelő hidratáltságuk^{59,60} [S18], amelyet a számítások során a fehérje szolvatálásával érhetünk el. Ez történhet implicit oldószermodellel⁶¹ [S12,S20] vagy explicit módon, vízmolekulák segítségével. QM/MM számítások során mindig a fehérje vízmolekulákkal történő szolvatációját választottuk. Egy vízdobozt helyezünk a fehérjére, s kitöröljük a dobozból azokat a vízmolekulákat, amelyek a fehérje atomjaival összeütköznek. A rendszer ösztöltését célszerű ellenionokkal semlegesíteni (általában Na⁺ vagy Cl⁻ ionokkal, de pl. nukleinsavak esetén Mg²⁺ ionokat szoktak használni), és megítélés szerint az oldószerben be lehet állítani a fiziológiás sókoncentrációt is. Ezt követően rövid molekuladinamikai számítás segítségével, amely során csak a vízmolekulák (és ionok) mozoghatnak, hozzuk egy „előegyensúlyi állapotba” a rendszert. Érdeemes ellenőrizni, hogy a fehérjék zsebei, és különösen az aktív helyek is megfelelően hidratálva legyenek. Többféle vízmodellt alkottak meg az elmúlt évtizedekben, amelyek a tömbfázisú víz tulajdonságainak minél pontosabb leírását célozzák. Biomolekulák modellezésére legelterjedtebben a három paraméteres TIP3P vízmodellt használják, s mi is ezt tettük, de bizonyos esetben vizsgálatainkat a TIP4P, TIP4P/2005⁶², TIP4Pew⁶³, OPC⁶⁴, vízmodellekkel is elvégeztük.

A fehérje szolvatációját általában a fehérje szerkezetének a MM erőterrel történő minimalizálása követi, amelyet több lépésben hajtunk végre, először csak a fehérje oldalláncait engedjük szabadon mozogni, majd ezt követi a teljes fehérje szerkezetének minimalizálása. Számításainkban minden esetben a CHARMM27 erőteret használtuk.⁶⁵

(2) Fehérjék konformációs terének részleges feltérképezése, és kiindulási szerkezetek kiválasztása a QM/MM számításokhoz.

Mivel a fehérjék konformációs tere bonyolult, ezért annak részleges feltérképezéséhez molekuladinamikai szimulációkat használtunk fel. Enzimreakciók modellezése során vagy a teljes rendszert, vagy csak a vízburkot az aktív helytől 25Å sugarú körben csonkítottuk, és sztochasztikus határfeltételeket alkalmazva végeztük el a számításainkat. Ezzel ellentétben gázmolekula diffúzió vizsgálata során periodikus határfeltételekkel végeztük a számításainkat.

(3) QM és MM régió modellezésére használt módszerek kiválasztása és összekapcsolása

Sokféle QM/MM módszer létezik az irodalomban, amelyek közül csak párat emelek ki.

➤ *Mechanikus, elektrosztatikus, polarizációs beágyazás*

A QM és MM régió kapcsolata alapján különféle beágyazási módszerek léteznek. Az első QM/MM módszerek mechanikai beágyazást alkalmaztak, amely a rétegek közti kölcsönhatást MM szinten vette figyelembe (pl: IMOMM,⁶⁶ IMOMO,^{67,68} ONIOM⁶⁹). Ezek a rendszert n részre osztják (jellemzően 2-3), melyeket eltérő szinten kezelnek. A rendszer teljes energiáját szubsztraktív formalizmussal határozzák meg:

$$E = E_{MM}^{teljes rendszer} - E_{MM}^{QM régió} + E_{QM}^{QM régió} \quad (3)$$

ahol az alsó indexben lévő MM, illetve QM rövidítések a számolás szintjét jelentik.

Az elektrosztatikus beágyazást alkalmazó módszerek lehetővé teszik, hogy az MM régió a QM régiót polarizálja. Ez úgy érhető el, hogy a QM régiót leíró Hamilton operátor olyan egyelektron integrálokkal egészül ki, amelyek formálisan a mag-elektron kölcsönhatásokat leíró taggal analóg módon írják le a kölcsönhatást, de a magok helyett az MM ponttöltések koordinátáit tartalmazzák. Az energiaszámítás ekkor az ún. additív séma szerint történik:

$$E = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM/MM} \quad (4)$$

Ekkor a rendszer teljes energiáját a QM, az MM és a közöttük lévő kölcsönhatásból származó energiatag ($E_{QM/MM}$) együttesen határozza meg. Ez utóbbi három energiatagból tevődik össze: (1) a QM-MM régió határán elhasított kémiai kötések energiájából, (2) a QM részsámításokban megjelenő elektrosztatikus kölcsönhatásból, (3) a QM és az MM régió közötti diszperziós és kicserélődési kölcsönhatásokból, melyeket MM Lennard-Jones potenciál ír le.

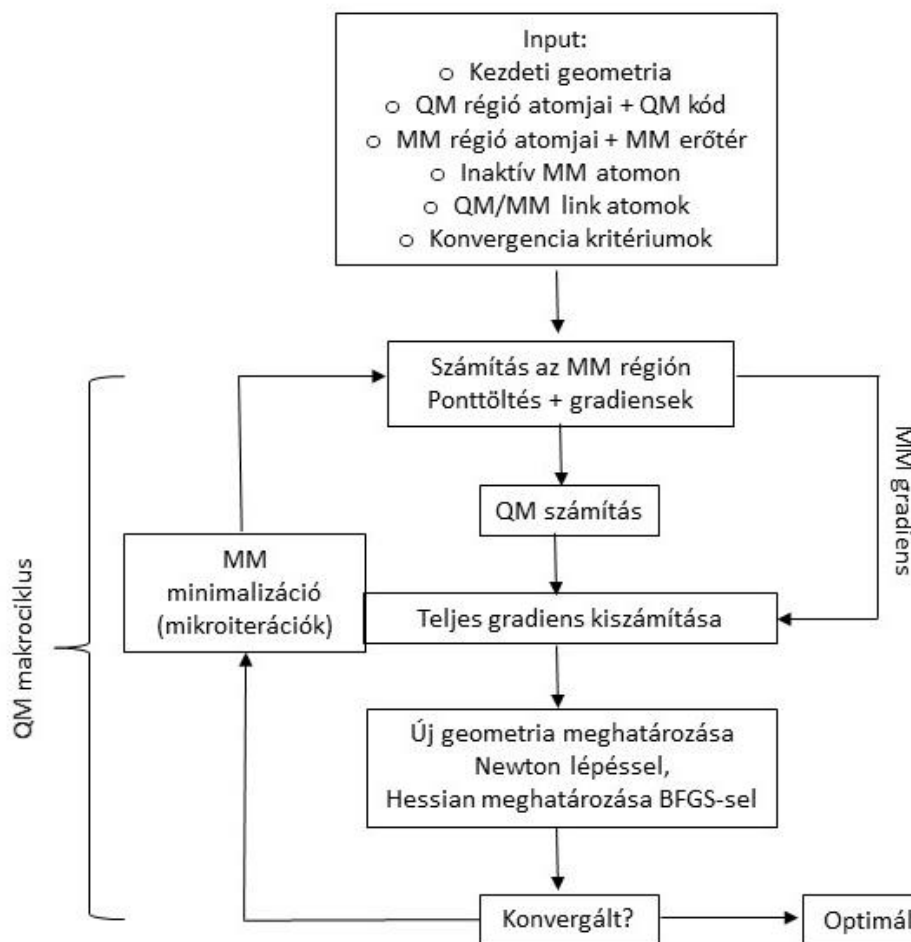
A polarizációs beágyazódási módszerek már bizonyos mértékben lehetővé teszik, hogy a QM régió is polarizálja az MM régiót, polarizálható erőterek segítségével. Ekkor azonban problémát okoz, hogy a QM régióhoz közeli MM atomok polarizációja természetellenesen

nagynak adódik,⁷⁰ amelynek kiküszöbölésére ún. önkonzisztens (self-consistent) módszer vagy a mátrix inverziós technikán alapuló ún. direct reaction field (DRF) módszer⁷¹ lehet alkalmas. Ezek a technikák még fejlesztés alatt állnak, és nem feltétlenül adnak kielégítő eredményt.,

➤ *QM/MM program kiválasztása*

Nagyon sokféle programmal végezhetünk QM/MM számításokat. A MD szimulációkra alkalmas programcsomagok jelentős része, pl. a CHARMM, AMBER, GROMACS is ad lehetőséget QM/MM számítások elvégzésére, pl úgy, hogy valamilyen QM számításokra alkalmas programcsomagot meghív (vagy beépített szemiempirikus/DFTB3 módszereket tartalmaz).⁷² Ezek a módszerek általában felváltva végeznek egy QM és egy MM optimalizációs lépést. Hasonló módon számos QM program is alkalmas lehet QM/MM számításokra, pl. a Gaussian, vagy az ORCA. Ezeknek a módszereknek hátránya lehet, hogy nagyon sok iterációs lépést igényelnek. Erre a problémára vetették fel megoldásként a mikroiterációs sémát,⁷³ amelyben minden egyes QM számítás után elvégzik a teljes MM rész optimalizációját.⁷³ Ezt a megoldást használja ki a Chemshell⁷⁴ vagy az általunk használt QoMMMA⁷⁵ amelynek a működési elvét a 2. ábra mutatja.

A QoMMMA egy pythonban írt kód, amelyet Jeremy Harvey írt a bristoli egyetemen. Többféle QM számításokra alkalmas programot képes meghívni (ezek közül az interface-t az ORCA^{76,77} programcsomag meghívására volt diákom Papp Marcell készítette el), majd egybefűli a QM és az MM program (mi esetünkben Tinker⁷⁸) által generált output fájlokat, és elmozdítja a geometriát Newton módszer felhasználásával, valamint ellenőrzi, hogy a geometriaoptimalás során elértük-e a konvergencia kritériumokat.



2. ábra A QoMMA program által végrehajtott QM/MM számítások fontosabb lépései.

(4) QM régió atomjainak kiválasztása

A QM régió atomjainak kiválasztása nem triviális. Klasztermodell esetében azt találták, hogy a rendszer méretének változása jelentősen befolyásolja a (27-132 atom között) az aktiválási energiát illetve a reakcióhőt.⁷⁹ Noha QM/MM számítások esetén ez a hatás valamivel kisebb, túl kicsi QM régió esetén lehetséges, hogy a második szférás atomok, vagyis azok atomok, akik a reagáló fragmensekhez közel találhatóak, de konkrétan a kötések változásában nem vesznek részt, nem tudnak elegendő töltést/gyökös karaktert biztosítani a reagáló atomoknak. Ezzel szemben túl sok töltött oldalláncot kvantummechanikai figyelembevétele könnyen túlpolarizálhatja a QM régiót, hasonlóan a nagyszámú kötés elhasításához a két régió határán. Ezért mindig célszerű apoláros C-C egyesítőket elhasítani.

(5) Reakciókoordináta kiválasztása

A kvantumkémiai számításokban egy reakció átmeneti állapotainak mindig a PES megfelelő elsőrendű nyeregpontjait tekintjük, ahonnan a reakcióút a termékekhez és a

reaktánsokhoz vezet. QM/MM számítások során gyakran nem áll olyan módszer a rendelkezésünkre, amellyel nyeregpontot keressünk. Ezért a reaktánsok és a termékek ismeretében ki kell választanunk egy megfelelő reakciókoordinátát (amelyet bizonyos módszerek esetén (pl. metadinamika⁸⁰) kollektív változóknak is szoktak hívni). Ehhez leggyakrabban a kémiai intuíciót használjuk, s általában kötéstávolságokat, és kötéstávolságok összegét/különbségét használjuk reakciókoordinátaként. Más programcsomagok lehetőséget adhatnak diéderes szögek, vagy szögek felhasználására is reakciókoordinátaként.

(6) (Aktiválási) energiát vagy (aktiválási) szabadentalpiát szeretnénk meghatározni?

Számításos kémiai modellezés során nagyon fontos, hogy össze tudjuk vetni az eredményeinket kísérleti adatokkal. A legtöbb esetben a mért energetikai adatokból, termékarányokból szabadentalpia jellegű mennyiségeket származtathatunk, és ezért érdemes lenne szabadentalpiát számítani energia helyett. Ugyanakkor már gázfázisú számítások esetén is az energiaszámításhoz képest további közelítéseket igényel a szabadentalpia számítása (pl. gyakran feltételezik a partíciós függvények meghatározásakor, hogy a molekula leírható az ideális gáz/merev rotátor/harmonikus oszcillátor modellel.⁸¹ Biológiai rendszerek esetén pedig nagyon komoly erőforrást igényel a fehérje/nagyobb rendszer konformációs terének felderítése és a szabadentalpia meghatározása. QM/MM számítások esetén akkor szoktak szabadentalpiát meghatározni, ha viszonylag alacsony szintű QM módszert használnak (pl. szemempirikus módszereket, vagy DFTB3⁷²) esetleg nagyon kicsi a QM régió.⁸²⁻⁸⁴ Mi a QM/MM számításaink során mindig energiaprofilokat határoztunk meg.

3. Citokróm P450 enzimek vizsgálata

A hemcsoport a legfontosabb, enzimekhez kapcsolódó proszterikus csoport az élő szervezetekben, amelyben egy központi vasion található egy porfirin gyűrűhöz kötve. A hemcsoport kiemelt szerepet játszik az aerob élőlényekben az oxigén homeosztázisban: hisztidin-oldallánchoz koordinálódó hemcsoportot tartalmazó hemoglobin és mioglobin felelős az oxigén megkötéséért, tárolásáért és szállításáért, míg citokróm P450 enzimek (CYP vagy P450),^{85,86} amelyek cisztein-oldallánchoz kötődnek, képesek a molekuláris oxigén O=O kötését felhasítani, lehetővé téve, hogy az élőlényekben az oxidációs reakciók hatékonyan és biztonságosan menjenek végbe.

A CYP enzimek szupercsaládjába a ciszteinátcsoporthoz kapcsolódó hem-fehérjék tartoznak. Itt a dolgozat elején szeretném két fontos megnevezésre felhívni a figyelmet. A hemgyűrűnek azt az oldalát, amelyiken a fehérjemátrixhoz kötődik (ciszteinátcsoporton keresztül a CYP enzimekben, vagy hisztidinen keresztül Fe(II)-tartalmú fehérjékben) proximális oldaldnak, a másikat pedig disztális oldaldnak hívjuk. A ligandumok/szubsztrátok általában a disztális oldalon elhelyezkedő zsebbe kötődnek be. Mára több mint húszezer különböző CYP enzimet ismerünk, amelyeket családokba és alcsoportokba sorolunk, s ezt követi az elnevezésük is: pl. a CYP3A4 elnevezésű enzim a 3-as család A alcsoportjának 4-es számú enzime.

Gyakorlatilag minden élőlényben, baktériumokban, és ősbaktériumokban, gombákban, növényekben és állatokban is megtalálhatóak. Legfontosabb feladatuk a testidegen anyagok (xenobiotikumok) oxidációja, így segítik elő azok lebomlását, kiürülését, ezzel védve a gazdaszervezetet.⁸⁷⁻⁸⁹ Mivel az emberi szervezet számára a gyógyszerek is idegen anyagként jelennek meg, a gyógyszeripar számára lényeges ismerni a gyógyszer- és gyógyszerjelölt-molekulák metabolizmusát. Bizonyos CYP enzimek egyéb feladatokra is szert tettek az evolúció során, így pl. az aromáz enzim^{90,91} az emberben a szteroid hormonok bioszintézisét katalizálja, míg az egyes gombákban megtalálható P450_{nor} enzim a nitrogén-monoxid redukcióját segíti elő.

A CYP enzimek általában monooxigenázként működnek:



Leggyakrabban alifás és aromás hidroxilációt, epoxidációt, N- és O-demetilációt, és heteroatomok oxidációját katalizálják.⁸⁶ Mivel képesek inert C-H kötések aktiválására ezért katalizátor tervezés szempontjából is igen érdekesek.^{92,93} Az utóbbi években jelentős erőfeszítések irányulnak natív enzimeknél nagyobb hatékonysággal dolgozó a külső környezeti

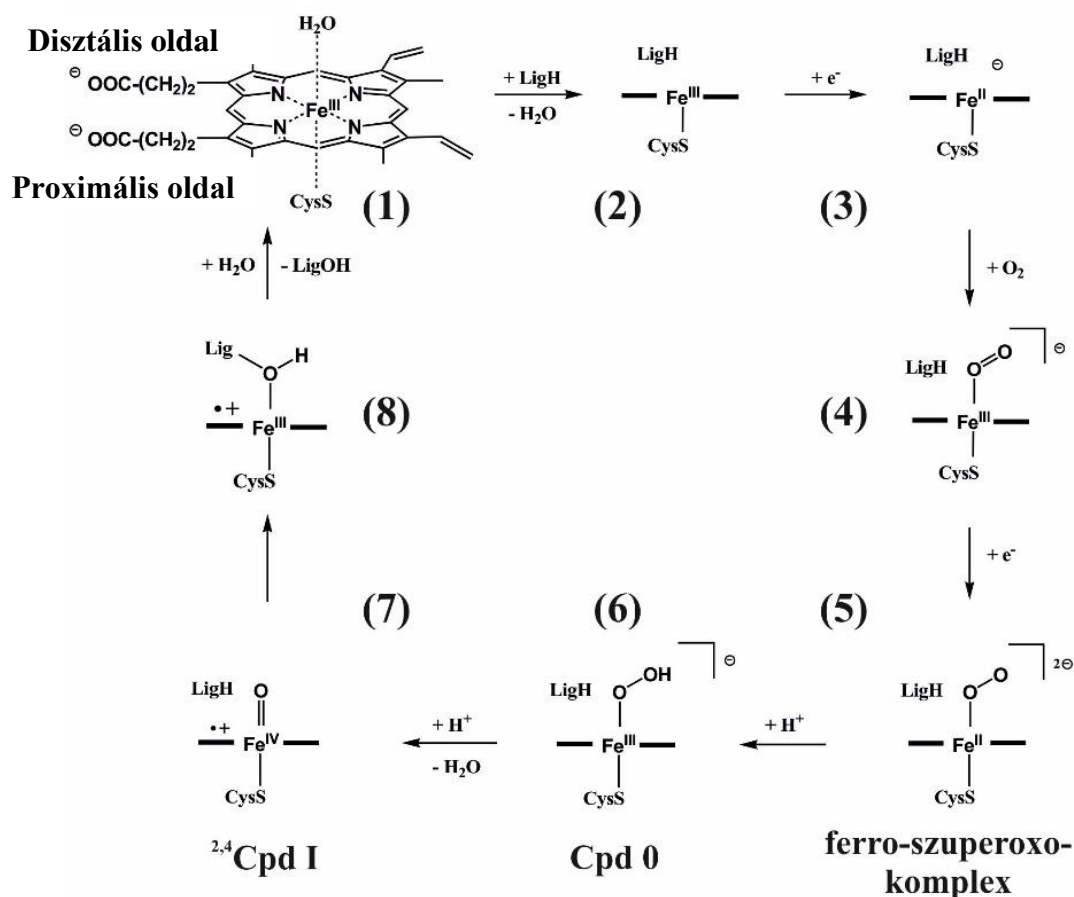
hatásoknak jobban ellenálló variánsoknak az előállítására, amelyek célzottan és hatékonyabban segíthetnék különböző gyógyszerek vagy egyéb vegyszereket előállítását.⁹⁴ Ehhez az enzimeknek, a redox partnereiknek, szubsztrát- vagy elektronforrásoknak újratervezésével próbálkoznak.

A CYP enzimek fontos tulajdonsága, hogy – a központi vas-porfirin komplex bonyolult elektronszerkezetének köszönhetően – többféle spin állapotban, különböző elektronszerkezetű ionos és gyökös karakterű köztitermékeken át képesek reagálni.^{85,95–97} A számos lehetséges útvonal közül – melyek gyakran különböző termékeket eredményezhetnek – mindig az adott enzim, a szubsztrát szerkezete, és a külső körülmények határozzák meg, hogy melyik reakcióút játszódik le legvalószínűbben.

Leggyakrabban az oxiferrilkomplex – melyet compound I-nek (Cpd I) hívnak a szakirodalomban – reagál közvetlenül a szubsztráttal, de arra is van példa, hogy az egy elektronnal redukált formája, a compound II (Cpd II) vagy az általános katalitikus ciklusban (3. ábra) korábban képződő ferro-szuperoxokomplex a hatékony ágens.

A CYP enzimek általában multisubsztrát enzimek és a keletkező termékek anyagi minőségét és arányát a szervezetben számos faktor befolyásolja. Ide tartozik az enzimek (1) izoforma szelektivitása (vagyis, hogy melyik szubsztrátot melyik aminosavsorrendben és 3D szerkezetben is különböző enzimvariáns képes oxidálni) (2) kemoszelektivitása (melyik funkciós csoport oxidálható a legkönnyebben) és a (3) régiószelektivitása (gyógyszermolekula melyik pontján oxidálódik pl. ugyanaz a funkciós csoport előfordulhat több helyen is a molekulában). Az izoformaszelektivitást jelentősen befolyásolja az, hogy mely izoformák milyen arányban és szöveti eloszlásban vannak jelen, hiszen pl. nagyon sok gyógyszert a CYP3A4 oxidál egyszerűen azért, mert ez van jelen a szervezetben (és a májban) a legnagyobb mennyiségben. Szerepet játszik ezen kívül a szubsztrátok kötési affinitása a különböző izoformákhoz, és az indukciós hatások is. Bizonyos vegyületek indukálhatják CYP gének transzkripcióját és translációját, így az adott CYP enzim ebben az esetben nagyobb koncentrációban lesz jelen).

Ebben a fejezetben a CYP enzimek kemo- és régiószelektivitásának néhány aspektusát tárgyalom. Először összehasonlítom a Cpd I elektronszerkezetét különböző izoformákban, s megvizsgálom, hogy ez befolyásolhatja-e az enzimek oxidáló képességét, szubsztrát- és régióspecifitását. Ezt követően arra keresem a választ, hogy milyen faktorok befolyásolják a dextrometorfán és az ösztrogénhormonok metabolizmusát, végül pedig a humán aromataz enzim működési mechanizmusát mutatom be.



3. ábra CYP enzimek általános katalitikus ciklusa. A porfirin gyűrű pontos szerkezete a nyugalmi helyzetben ((1)-es állapot) látható. A többi állapotban vastag fekete vonalak jelképezik a porfirin vázat. LigH: szubsztrát, LigOH: termék. A ciszteínátligandum a hemgyűrű proximális, míg az oxigénmolekula a disztális oldalon kötődik meg.

3.1. CYP enzimek aktív formájának (Compound I) reaktivitása [D1]

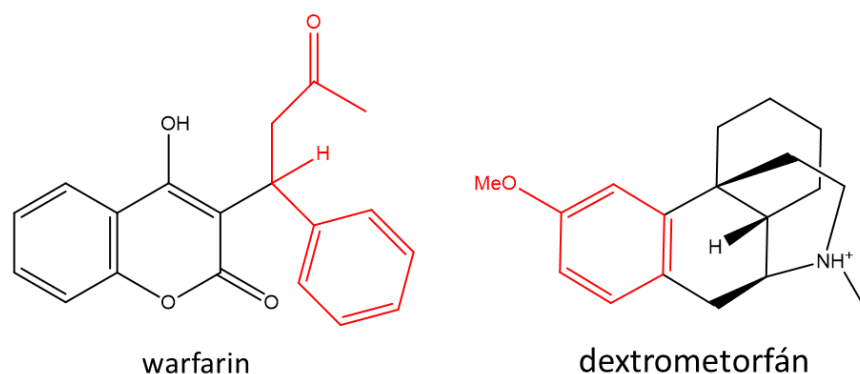
Fent láttuk, hogy a CYP enzimek aktív formája a Cpd I, amely egy vas(IV)-oxo-gyök kation speciesz, és erős oxidáló hatással rendelkezik. Nagyon sokféle kémiai átalakulást tud katalizálni. Az ismert több mint húszezer CYP enzim, valamint az általuk katalizált reakciók sokfélesége felveti a kérdést, hogy mennyire befolyásolja a keletkező termékek anyagi minőségét az aktív forma elektronszerkezete, s hogy van-e jelentős különbség az egyes CYP izoformák aktív formái között, vagy ezek hasonlóak tekinthetőek-e.

Ez a gyógyszeripar számára is jelentős kérdés. Már a gyógyszertervezés korai fázisában hangsúlyt fektetnek arra, hogy felderítsék milyen metabolitok jöhetnek létre a vezér- és a gyógyszerjelölt-molekulákból. Toxikus termékek képződését a lehető leghamarabb ki kell zárni, ahogy azokat a molekulákat is, amelyek a CYP enzimek inhibitorai lehetnek, hiszen ez

nem várt gyógyszerkölsönhatásokhoz vezethetne. Ehhez többek között *in vitro* modelleket,⁹⁸ *in silico* módszereket,^{99–101} és biomimetikus katalizátorokat¹⁰² is felhasználnak.

A modellezés során nagyon fontos lenne tudni, hogy mennyire hasonló a különböző CYP izoformák katalitikus hatása, hiszen az emberi szervezetben 57 különböző CYP izoforma ismert.¹⁰³ Ezért számos szemszögből összehasonlítottuk a három legfontosabb emberi gyógyszermetabolizáló CYP enzim (2C9, 2D6, és 3A4) és a bakteriális P450cam enzim Cpd I formájának a tulajdonságait. Többek között vizsgáltuk a vas és a proximális oldalon található ciszteinátcsoport közti kötéstávolságot, a Cpd I elektronszerkezetét (pl. spinsűrűségek segítségével, valamint megbecsültük a Cpd I Fe-O kötési entalpiáját és ezen keresztül értelmeztük az oxidáló hatását. Megnéztük, hogy ezeket a tulajdonságokat milyen mértékben befolyásolja a szubsztrát jelenléte az aktívhelyen.

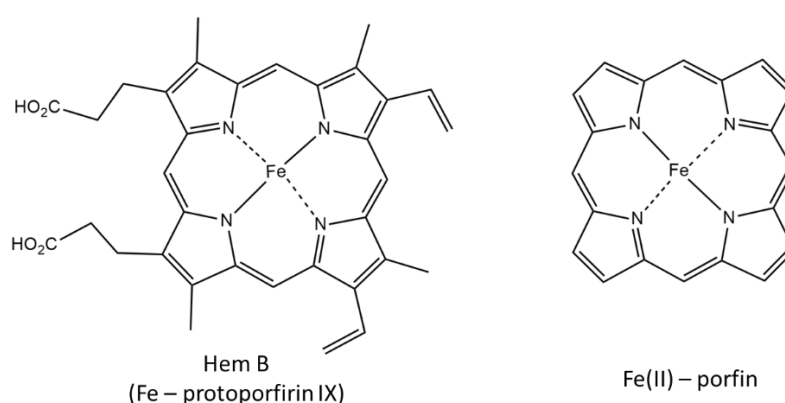
9 rendszert választotunk ki a számításainkhoz. A CYP2C9 enzim esetében három szerkezetet vizsgáltunk: (1) szubsztrát nélküli forma (2C9_apo) (2) 2 warfarin (gyakran alkalmazott gyógyszer) molekulát tartalmazó szerkezet (2C9_2warf) (4. ábra) (3) 1 warfarin molekulát tartalmazó szerkezet, amelyben a szubsztrát közvetlenül a hemcsoport felett található (2C9_prox). A 2D6 és 3A4 izoformák esetén a számításokat elvégeztük szubsztrátot nem tartalmazó rendszerek esetén (2D6_apo és 3A4_apo), valamint dextrometorfán (szintén a gyógyászatban használt) szubsztráttal. A P450cam rendszer esetén a szimulációkat propén szubsztrát jelenlétében (P450cam_prop) és hiányában (P450cam_apo) hajtottuk végre.



4. ábra A warfarin és dextrometorfán szerkezete. Piros jelöli a QM régióban figyelembe vett molekularészeket. A CYP3A4 enzimben a teljes dextrometorfán szubsztrát az MM régióba tartozott, míg a CYP2D6 enzim esetén két módon is elvégeztük a számításokat: egyrészt, hogy a pirossal jelölt rész a QM régióban volt, és úgy, hogy a teljes molekula az MM régióhoz tartozott.

Minden rendszeren 5ns hosszúságú MD szimulációt végeztünk sztochasztikus határfeltételekkel a CHARMM27 erőterrel és a CHARMM programmal. 200 ps -onként mintát

vettünk, hogy egymástól függetlennek tekinthető konfigurációkat állítsunk elő és QM/MM módszerrel (QM módszer: B3LYP/6-31G* szinten, ahol a vason a lacvp** bázist és pszeudopotenciált alkalmazva) optimáltuk a rendszer szerkezetét. Ezután kitöröltük a ferril oxigént (vagyis a Cpd I oxigénjét) és egy single-point energiaszámítást végeztünk a rendszeren, hogy meghatározzuk a Fe-O kötési entalpiáját, illetve ezen entalpia érzékenységét a környezet változására. A CYP enzimekben található hem B-t (Fe-protoporfirin IX) Fe-porfin gyűrűvel vettük figyelembe a számítások során és a disszertációban bemutatott többi tanulmányban is (5. ábra). A QM régió ezen kívül tartalmazta a központi vasion axiális ligandumait: a ferril oxigént, valamint a tiolsoportot, amely az axiális ciszteinátcsoportot modellezte.

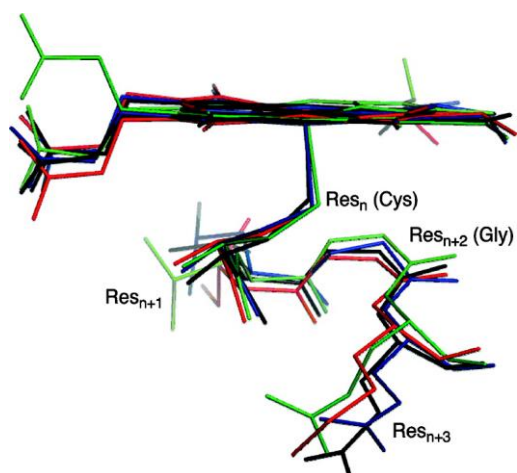


5. ábra Hem B és a modellezéshez használt QM régióban figyelembe vett Fe-porfin rendszer szerkezete. A QM/MM számítások QM régiójában is Fe(II)-porfin gyűrűvel modelleztük a hem B-t.

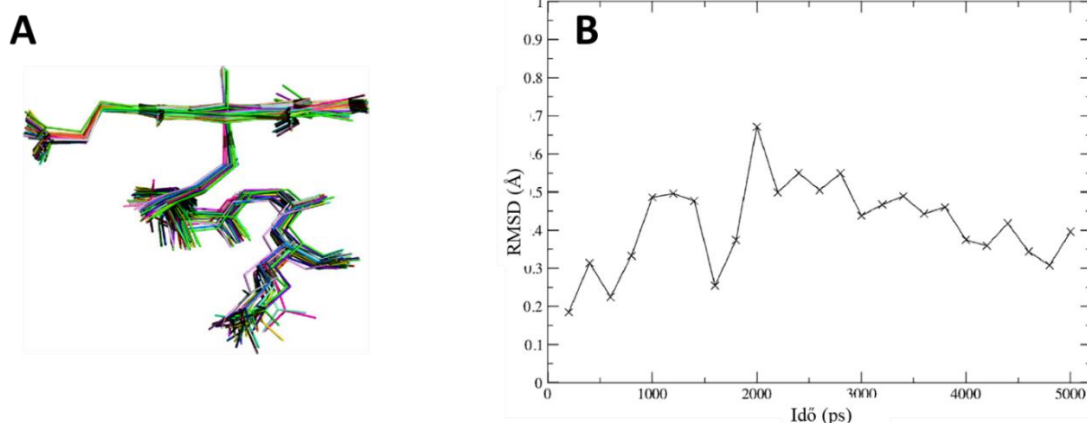
A 6. ábra mutatja a vizsgált kristályszerkezeteket összeillesztve. Jól megfigyelhető, hogy a négy enzimben a porfirin-gyűrű környezete nagyon hasonló az evolúció során keveset változó szerkezetet takar, és az axiális ciszteinátcsoportot követő aminosavak gerincének szerkezete is jól illeszkedik, amelyek amidcsoportjuk N-H hidrogénjén keresztül hidrogénhid kötést alakítanak ki a ciszteinátcsoporttal. A QM/MM számítások során nyert szerkezeteket is összeillesztettük a 2C9 enzim esetén (7. ábra), amely nagyon hasonló képet mutat a különböző CYP izoformák összeillesztésével nyert képhez. Az ábra jobb oldalán az MD szimuláció kezdőpontjánál vett szerkezet QM/MM optimált geometriájához mért RMSD^a értékek láthatóak. Ez alapján a termális fluktuáció okozta hatások közel olyan jelentősek a fehérje ezen részén, mint az aminosavsorrendből adódó különbségek.

$$^a \text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (r_i(t_0) - r_i(t))^2}{N}}$$

ahol N az atomok számát jelöli, $r_i(t)$ az i -dik atom pozícióját a t -edik időpillanatban, $r_i(t_0)$ az i -dik atom pozícióját a 0ps-os szerkezetben.



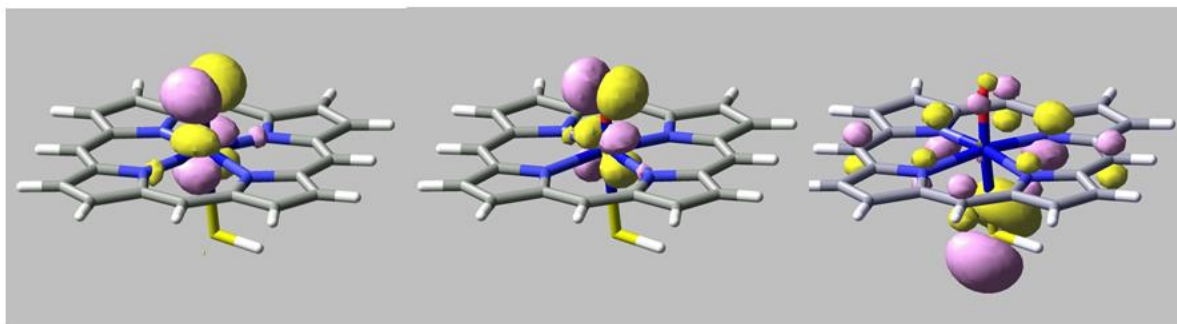
6. ábra A proximális ciszteinát-oldalláncot követő aminosavak egymásra illesztett szerkezete a vizsgált kristályszerkezetekben: P450cam (1DZ9, zöld), CYP2C9 (1OG5, fekete), CYP2D6 (2F9Q, kék), és CYP3A4 (1TQN, piros). Mivel az aminosavak számozása a különböző fehérjék esetén eltér, ezért Res_n a közvetlenül a vashoz kötődő ciszteinátot jelenti, amelynek sorszáma n az adott fehérje aminosavsorrendje szerint. A Res_{n+2} aminosav mindegyik vizsgált fehérjében glicin volt.



7. ábra A 2C9_dist rendszer QM/MM optimált szerkezeteinek (A) egymásra illesztése (B) átlagos négyzetes eltérése (RMSD) a 0 ps-os szerkezethez képest. Az ábrán csak a Cpd I, Cys435, Leu358, Gly359 és Gln360 látható, s ezek atomjait használtuk fel az RMSD számításához is.

Vizsgáljuk most meg a Cpd I elektronszerkezetét: ez egy Fe(IV)-oxo porfirinyök-kation speciesz, amely három párosítatlan elektron tartalmaz. (A Cpd I oxigénjét szokták ferril oxigénnek nevezni.) Ezek közül kettő a vashoz és ferril oxigénhez tartozó lazítópályán helyezkedik el, amelyek nagyon gyengén csatolódnak egy porfirinyűrű alapú aromás pályát és a kén nemkötő elektronpárját magába foglaló egyszeresen betöltött molekulapályával (8. ábra).⁸⁵ A gyenge csatolás miatt a Cpd I kvartett és dublett állapotai között az

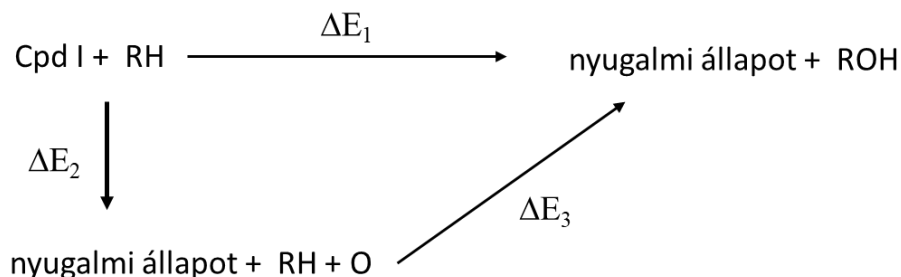
energiakülönbség igen alacsony (1 kcal/mol alatt), így az enzim mindkét ponteciálfelületen tud reakciókat katalizálni, s ezt nevezik kaméleonhatásnak.³³



8. ábra Cpd I egyszeresen betöltött molekulapályái (szürke: szén, sötétkék: vas, világoskék: nitrogén, fehér:hidrogén, sárga: kén, piros:oxigén)

Jellegzetes kötéstávolságokat és spinsűrűségeket is felhasználhatunk a a Cpd I szerkezetének és elektronszerkezetének jellemzésére. Minden egyes vizsgált esetben 25 szerkezetet optimaltunk QM/MM módszerrel. Az így számított adatok átlagát és szórását a 1. táblázat tartalmazza. Nincs jelentős különbség a különböző szerkezetekben számított Fe-O és Fe-S távolságok között, ugyanakkor a szubsztrát jelenléte az aktív zsebben a Fe-S kötés erősödéséhez vezet, amelyet a rövidebb kötéstávolság fejez ki. A vason és oxigéneken számított spinsűrűségek is nagyon hasonlóak minden rendszerben. Egy jelentős különbség figyelhető meg: a P450cam-ban szinte minden esetben szignifikánsan nagyobb a spinsűrűség a porfirin gyűrűn és kisebb a kénen, mint az emberi izoformákban.

Szerettük volna összehasonlítani a Fe-O kötési entalpiát a különböző rendszerekben, mivel ez szoros összefüggésben van a Cpd I forma oxidáló képességével, amelyet egy termodinamikai ciklus segítségével értelmezhetünk (9. ábra). ΔE_1 a szubsztrát oxidációjának a reakcióhője, s a reakció közben az enzim visszanyeri a nyugalmi állapotát. Értéke negatív, vagy kis pozitív értéke, és függ a szubsztráttól. A Hess-tétel alapján $\Delta E_1 = \Delta E_2 + \Delta E_3$, ahol ΔE_2 a Fe-O kötés felhasításához szükséges energia, ΔE_3 pedig a szubsztrát oxidációja során felszabaduló hő, miközben az oxigén atom felvételével kialakul a termék. Első közelítésben ΔE_2 a szubsztráttól függetlennek tekinthető, s minél kisebb az értéke annál reaktívabb a Cpd I, és nagyobb az oxidáló képessége (1. táblázat)



9. ábra A Cpd I-ben található Fe-O kötési energia (ΔE_2) fontosságát jelző termodinamikai ciklus. RH: szubsztrát ROH: termék

ΔE_2 megbecsléséhez vettük a Cpd I QM/MM optimált szerkezetét (ennek energiája $E(\text{QM/MM}, \text{FeO})$) és ebből a geometria megtartása mellett kitöröltük az oxigén atomot, és dublett állapotban single-point számítással meghatároztuk a rendszer energiáját ($E(\text{QM/MM}, \text{Fe})$). Az így kapott energiakülönbség csak közelítő, hiszen nem veszi figyelembe a fehérje szerkezetének változását. A porfirin gyűrű relaxációjából eredő energiakülönbséget egy kvantumkémiai modell segítségével becsültük meg: kiszámítottuk a Cpd I-ből oxigénatom kitörlésével nyert szerkezet energiáját a Cpd I szerkezetén dublett állapotban ($E(\text{Fe}^*)$), valamint optimáltuk a rendszer szerkezetét szintén dublett állapotban ($E(\text{Fe})$). Az így nyert energiák különbsége 24,5 kcal/mol volt (B3LYP/LACVP,6-31G* szinten), s ez tekinthető első közelítésben a Cpd I relaxációjához tartozó energiakülönbségnek. (Itt érdemes megjegyezni, hogy a CYP enzimek spinállapota nyugalmi helyzetben szextett,^{104,105} és általában egy vízmolekula kapcsolódik a vascentrumhoz.) Ugyanakkor feltehető, hogy a dublett és szextett állapot közti energiakülönbség és a víz koordinációját/dekoordinációját kísérő energiaváltozás kicsi, és nagyon hasonló a különböző izoformákban, így a jelen tanulmány szempontjából elhanyagolható. Összességében: $\Delta E_2 = E(\text{QM}(\text{O})) + E(\text{QM}, \text{Fe}) - E(\text{QM}, \text{Fe}^*) + E(\text{QM/MM}, \text{Fe}^*) - E(\text{QM/MM}, \text{FeO})$.

1. táblázat. A QM/MM optimált geometriákban mért Fe-S és Fe-O kötéstávolságok (\AA), Mulliken spinsűrűségek (elektronban) a Fe, O, S atomokon és a porfiringyűrűn, és az Fe-O kötési entalpia (ΔE_2 , kcal/mol) szórással (σ). A ferril oxigén által kialakított hidrogénkötések száma ($N_{\text{HB}}(\text{FeO})$) az 5ns-os MD szimuláció során.

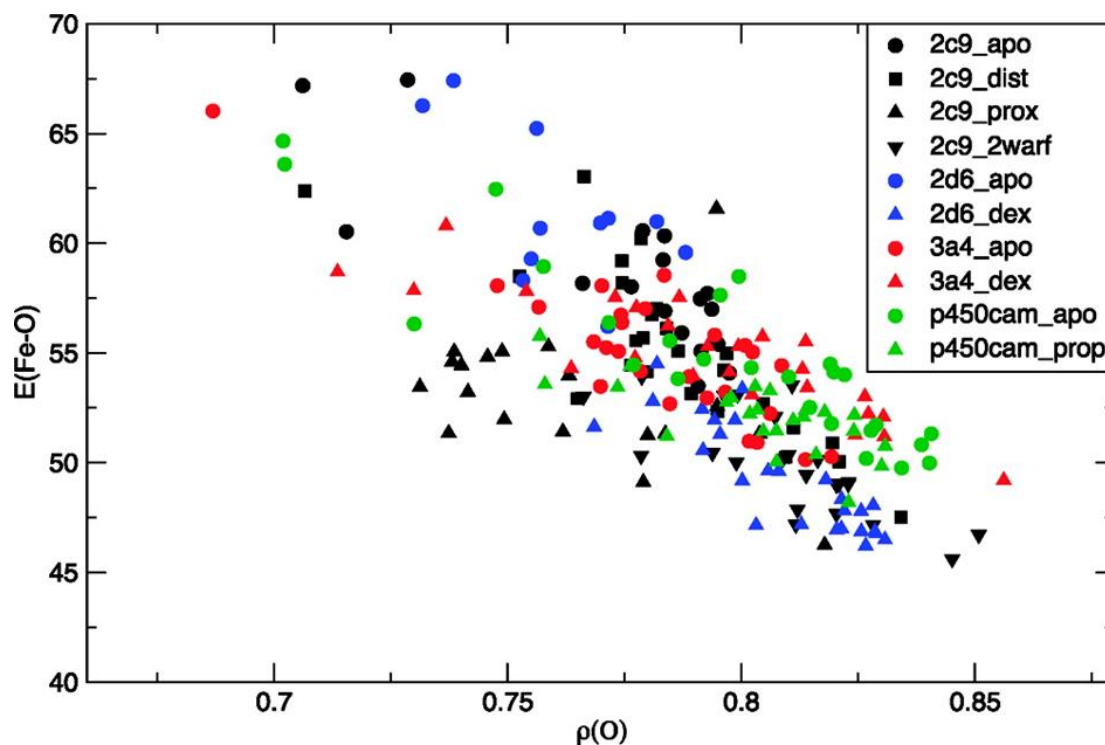
	Fe-S	σ	Fe-O	σ	$\rho(\text{Fe})$	σ	$\rho(\text{S})$	σ	$\rho(\text{O})$	σ	$\rho(\text{por})$	σ	ΔE_2	σ	N_{HB} (FeO)
2C9_apo	2,67	0,08	1,62	0	1,17	0,03	0,43	0,07	0,77	0,03	0,63	0,06	58,5	3,9	1,05
2D6_apo	2,69	0,05	1,62	0	1,15	0,03	0,41	0,04	0,76	0,02	0,62	0,03	56,1	2,3	0,50
3A4_apo	2,60	0,04	1,62	0	1,16	0,02	0,47	0,05	0,78	0,03	0,56	0,05	49,9	2,3	0,14
P450cam_apo	2,63	0,06	1,62	0	1,15	0,04	0,34	0,05	0,80	0,04	0,70	0,05	55,1	3,8	1,06
2C9_prox	2,61	0,03	1,62	0	1,18	0,03	0,46	0,06	0,76	0,03	0,56	0,06	61,5	3,5	0,92
2C9_2warf	2,62	0,06	1,62	0	1,14	0,02	0,40	0,04	0,81	0,02	0,62	0,05	49,3	2,5	0 ^a
2C9_dist	2,60	0,04	1,62	0	1,16	0,02	0,45	0,06	0,78	0,03	0,57	0,05	55,0	3,3	1,04
2D6_dex	2,59	0,03	1,62	0	1,14	0,02	0,37	0,04	0,81	0,02	0,66	0,04	54,9	2,7	1,15
3A4_dex	2,58	0,03	1,62	0	1,15	0,03	0,44	0,06	0,79	0,03	0,59	0,06	54,9	4,1	1,16
P450cam_prop	2,60	0,02	1,62	0	1,14	0,02	0,27	0,05	0,81	0,02	0,76	0,06	52,1	1,6	0,97

^a nem volt vízmolekula az aktív helyen, így nem alakult ki hidrogénkötés sem

A számított Fe-O kötésenergiák többsége a 49-62 kcal/mol tartományba esik, ennél nagyobb értékeket számítottunk azokban az esetekben, amikor a Fe-S kötés felhasadt. Ez utóbbiakat nem vettük bele az átlagolásba. A számított kötésentalpiák szórása viszonylag nagy, de nem figyelhető meg szisztematikus különbség az izoformák között, amely arra utal, hogy az egyes izoformák oxidálóképessége nagyon hasonló. Egy érdekes különbség azonban felfedezhető: szubsztrát jelenlétében az Fe-O kötés entalpia általában kicsit kisebb (pl. P450cam esetén 55,1 és 52,1 kcal/mol szubsztráttal s nélküle), amely erősebb oxidáló képességre utal. Fontos azonban tudni, hogy a valóságban szubsztrát hiányában nem indul be a katalitikus ciklus, és a Cpd I nem jön létre.

Többféle magyarázat is létezhet arra, hogy a Cpd I kötés entalpiája szubsztrát jelenlétében alacsonyabb: (1) a szubsztrát befolyásolja a Fe-O kötés polarizációját és megnöveli a Cpd I energiáját a nyugalmi helyzethez képest. (2) A szubsztrát megnöveli a nyugalmi állapot stabilitását és így csökkenti a Fe-O kötés felhasításához szükséges energiát. (3) A szubsztrát indirekt módon befolyásolja a Fe-O kötés entalpiát, pl. a fehérje konformációján vagy az aktív helyen található víz hidrogénkötéses hálózatán keresztül. Ahhoz, hogy ez utóbbit megvizsgáljuk az MD trajektóriák során meghatároztuk a ferril oxigén által kialakított hidrogénkötések átlagos számát (1. táblázat). A 2C9 rendszer esetében egyértelműen megfigyelhető, hogy ha a szubsztrát közvetlenül a hemcsoport felett helyezkedik el, akkor jelentősen csökken a hidrogénhid kötések száma: (2C9_diszt és 2C9_2warf összehasonlítva a 2C9_apo és 2C9_prox rendszerekkel. Feltehetően a nagyméretű szubsztrát kiszorítja az aktív helyről a vízmolekulákat, amelyek nyugalmi helyzetben az aktívsebet kitöltik, és ezért alacsonyabb az átlagos hidrogénkötés szám, ami energetikai változásokkal is jár, hiszen a H-kötések átlagos energiája 3-4 kcal/mol[S9,S17,S18]. A P450cam rendszer esetén, valószínűleg a propén kismérete miatt, a megfigyelt hatás kevésbé jelentős.

A 10. ábra szemlélteti az oxigénen számított spinsűrűség és a Fe-O kötés entalpiája kapcsolatát, amelyet a következő módon értelmezhetünk. A Fe-O kötés a Cpd I-ben két kétcentrumos háromelektron tartalmozó π -kötésből áll, amelyek az oxigén $p_x(p_y)$ és a vas $d_{xz}(d_{yz})$ pályái között alakulnak ki. Az oxigénnel kialakuló hidrogénkötés csökkenti az oxigén p pályáinak energiáját, ennek következtében a π pályák oxigén karaktere csökken, a π^* pályáké pedig növekedik. Amikor belép a szubsztrát az aktív helyre, kiszorítja a vízmolekulákat, ezáltal lecsökken a hidrogénkötések száma is a ferril oxigénhez, amely nagyobb átlagos spinsűrűséghez, kisebb Fe-O kötés entalpiához és erősebb oxidáló képességhez vezet. Ezzel összhangban, ahogy azt már korábban megmutatták analóg Mn(V)=O vegyületek esetén az oxigénatom nagyobb spinsűrűsége megnövekedett reaktivitással jár együtt.¹⁰⁶



10. ábra A Fe-O kötési entalpia ($E(\text{Fe-O})$) kcal/mol-ban a Cpd I ferril oxigén spinsűrűségének a függvényében a különböző CYP izoformákban (jelölésük az ábrán látható).

Összességében elmondhatjuk, hogy ebben a tanulmányban nem találtunk jelentős különbséget a vizsgált CYP izoformák Cpd I formáinak elektronszerkezete és oxidáló képessége között, így várhatóan ez nem befolyásolja az egyes izoformák szelektivitását.

3.2. CYP enzim által katalizált gyógyszermetabolizmus régiószelektivitását befolyásoló tényezők vizsgálata [D2]

A CYP enzimek kemo- és régiószelektivitását számos tényező befolyásolja. Az előzőekben láttuk, hogy a Cpd I komplexek hasonló reaktivitása a különböző enzimekben várhatóan nincs hatással a régiószelektivitásra. Számos módszert javasoltak a CYP enzimek hatására létrejövő metabolitok megjósolására, többek között tradicionális^{107,108} és háromdimenziós¹⁰⁹ szerkezet-aktivitás modelleket (QSAR, structure-activity relationship), farmakofór modelleket,¹¹⁰ DFT számításokat,⁸⁵ dokkolást,¹¹¹ szabályalapú^{100,112} és újabban gépi tanuláson¹¹³ alapuló módszereket is. Kereskedelmi forgalomban elérhető programcsomagok gyakran tartalmaznak metabolitprediktáló algoritmusokat. Ilyen pl. a Chemaxon által fejlesztett Metabolizer, vagy az IDSite a Schrödinger Inc-től.¹¹⁴

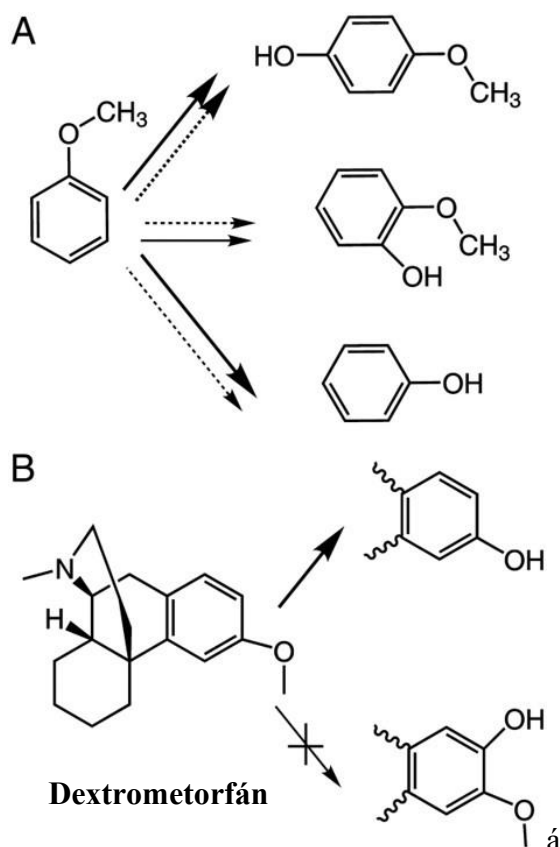
Amikor ennek az alfejezetnek a témájával foglalkoztunk, akkor még nem volt olyan tanulmány, amely egy valódi gyógyszermolekula metabolizmusát vizsgálta volna QM/MM-módszerrel. Olyan alkalmazás nem volt elérhető, amely hatékonyan kombinált volna különböző megközelítéseket.

A CYP2D6 enzim kiemelkedő szerepet játszik a káros gyógyszerhatásokban (ADR, adverse drug reaction) Azokat a gyógyszerhatásokat nevezzük károsnak, amelyekben nem szándékolt ártalmas vagy kellemetlen reakció játszódik le, mely a gyógyszer profilaktikus, terápiás vagy diagnosztikus alkalmazásával hozható összefüggésbe. Több mint száz változata (allélje) ismert, amelyek eltérő szintű enzimműködéshez vezetnek. Vannak egyének, akikben az enzim egyáltalán nem aktív, míg más gén variációk (allélek) sokszoros enzim túlműködéshez is vezethetnek. Mivel a metabolizmus sebessége befolyásolja a gyógyszerek hatásos dózist, az emberek közti különbségek ebben az esetben kifejezetten nagyok lehetnek. Pl. ha olyan gyógyszert szed valaki, amely a CYP2D6 szubsztrátja, de nincs működőképes CYP2D6 enzimje, akkor a gyógyszer vérszintje messze meg fogja haladni a terápiás dózist és mérgezéshez vezethet. Ha viszont a CYP2D6 enzim aktivitása nagyobb az átlagnál, jóval magasabb dózusra lenne szükség, hogy a gyógyszer vérszintje elérje a kívánatos szintet. Az egyének közti különbségek, amelyek káros gyógyszerhatásokhoz vagy hatékonyság csökkenéshez/elmaradásához vezetnek folyamatos kihívást jelentenek az egészségügyi ellátórendszer számára. Figyelemre méltó, hogy a betegek 6,5%-a ADR miatt kerül kórházba, amelyeknek akár 30%-a is életveszélyes lehet a veszélyeztetett populáción belül.^{115,116} Az egyéni különbségeknek 20-30%-ért a genetikai polimorfizmus (vagyis az allélek sokfélesége) a felelős.¹¹⁷ Tavaly elkészült a klinikailag jelentős CYP2D6 allélek európai elterjedtségét jelző térkép, amely várhatóan segíteni fogja a gyógyszerek hatékony adagolását a különböző területeken élő populációkban.¹¹⁸

Munkánkhoz szubsztrátként a dextrometorfánt választottuk ki, amely egy gyakran használt köhögéscsillapító. Metabolizmusa jól ismert: a CYP2D6 enzim a metoxicsoportját demetilezi. Meglepő ugyanakkor, hogy az anizollal ellentétben az aromás gyűrű oxidációja nem játszódik le, s ennek okát szerettük volna felderíteni (11. ábra).

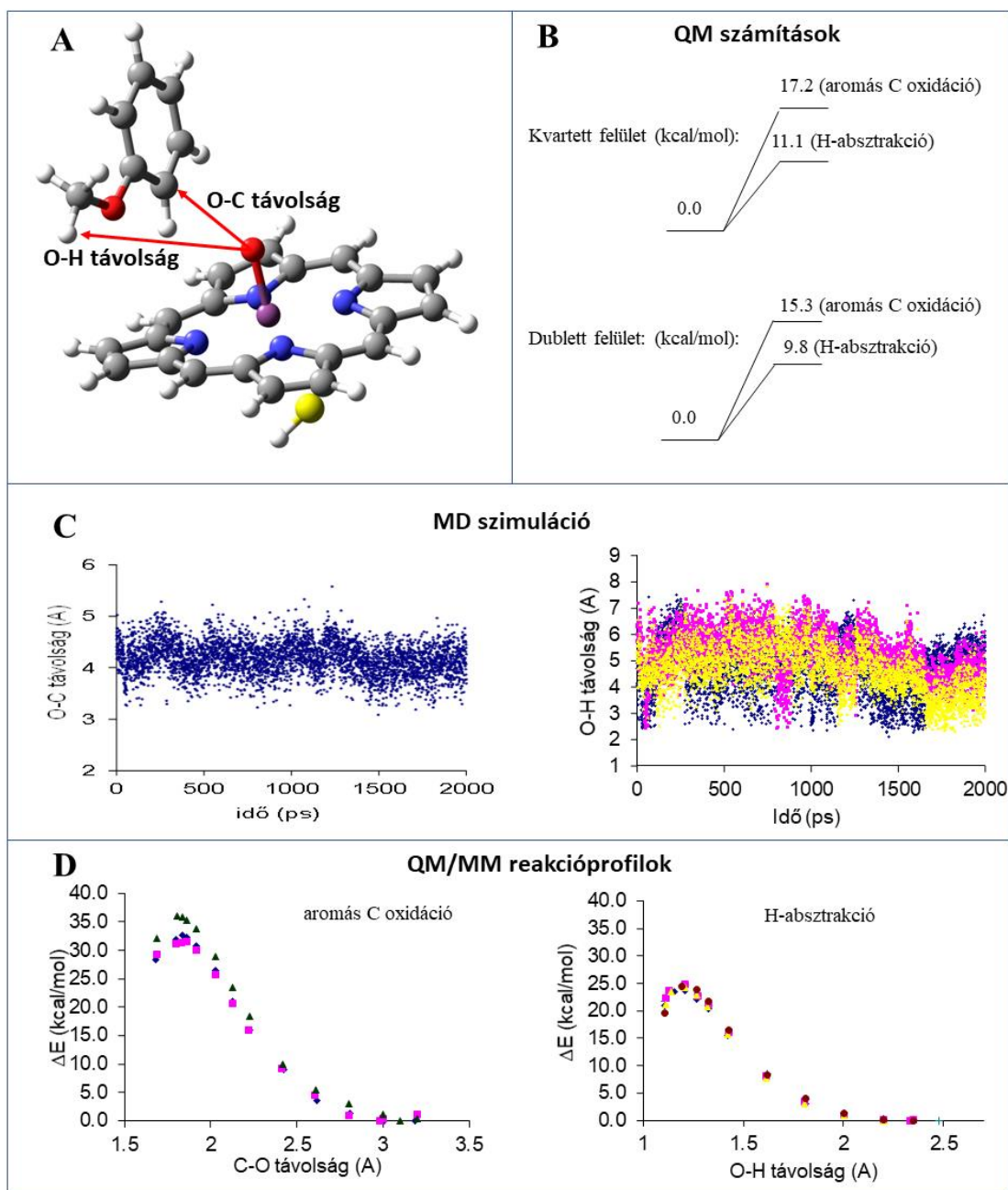
A modellezéshez DFT számításokat, dokkolást és MD szimulációkat, valamint QM/MM számításokat használtunk fel a 2. fejezetben bemutatott számítási protokollal összhangban. A 12. ábra A része mutatja a QM és QM/MM számításokban kvantumkémiai módon figyelembe vett molekularészeket: a vas-porfingyűrűt, az axiális oxo- és SH-ligandumokat (QM/MM-ben SCH₃-csoportként t), a dextrometorfán aromás gyűrűjét és a metoxicsoport). A QM és a QM/MM számításokhoz a B3LYP funkcionált használtuk. A geometriákat a lacvp** bázissal

optimáltuk, míg az energiák számításához a vason a lacv3p báziskészletet és pszeudopotenciált, a többi atomon pedig a 6-311++G** báziskészletet alkalmaztuk (ezt nevezzük BS1 báziskészletnek). A QM modellen végzett frekvenciaszámításokból nyert zéruspontrezgési energiák különbségeit a QM és QM/MM aktiválási energiák korrigálására is felhasználtuk.

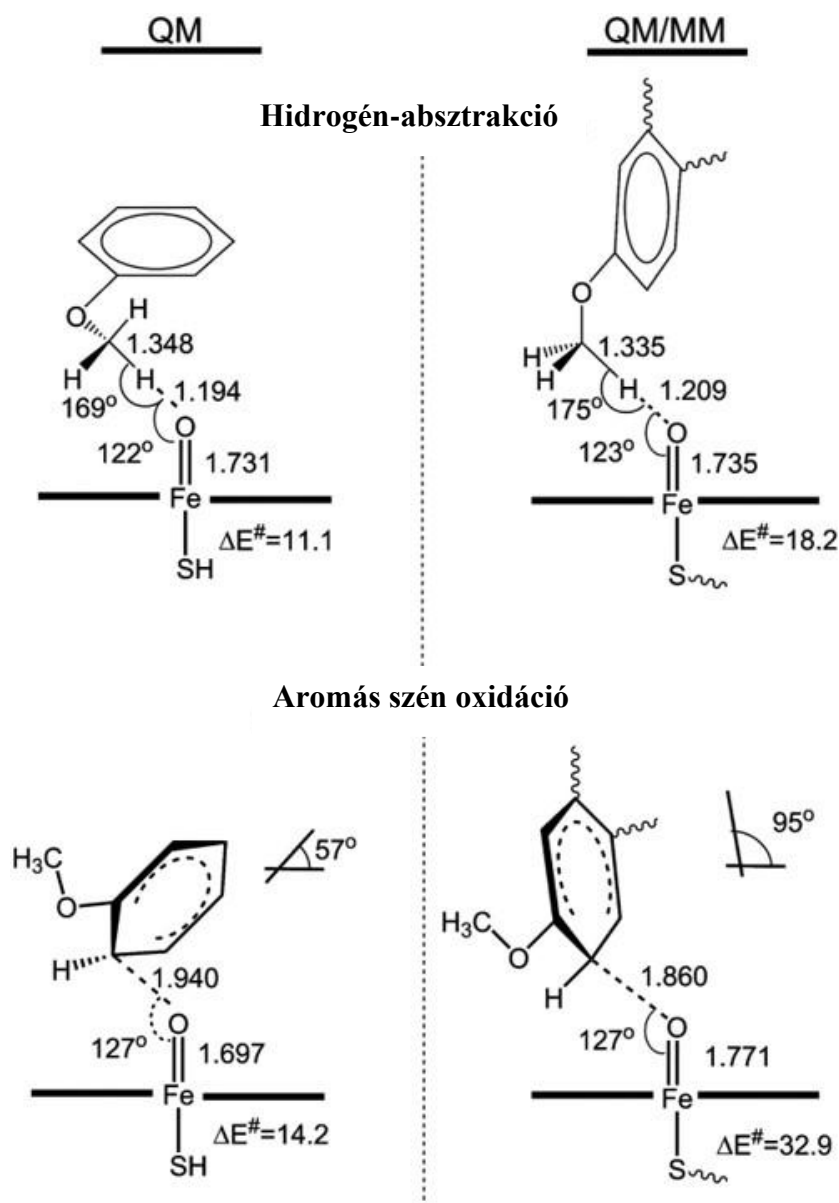


11. ábra Az anizol (A) és a dextrometorfán (B) metabolitjainak összehasonlítása.

Az eredményeket a 12. ábra és a 13. ábra mutatja. Az O-demetilációnak csak a sebességmeghatározó lépését modelleztük, miszerint a Cpd I egy hidrogénatomot szakít le a metoxicsoporról. (A következő lépésben a Cpd I-ből képződött hidroxilgyök visszakötődik a metoxicsoporra,¹¹⁹ amely végül demetilálódik). Az aromás szén oxidációja során a szubsztrát és a Cpd I adduktja alakul ki, amelyből vagy hidroxilált termék vagy epoxid keletkezik.⁸⁵ A QM számítások alapján mindkét reakció gátja alacsonyabb a dublett potenciális energiafelületen, mint a kvartett PES-en, továbbá a hidrogén-absztrakció (H-absztrakció) gátja 5,5-6,1 kcal/mol-lal alacsonyabb az aromás szén oxidáció gátjánál.



12. ábra (A) A QM számításokhoz és a QM/MM számítások QM régiójaként felhasznált modell (szürke: szén, piros: oxigén, fehér: hidrogén, sárga: kén, kék: nitrogén, lila: vas). (B) A hidrogén-absztrakció és az aromás szén oxidációjának a gátja QM számítások alapján (C) Az MD trajektória során mért O-C és O-H távolságok (a három különböző szín a metoxicsoport három ekvivalens hidrogénjéhez mért távolságot jelenti). (D) QM/MM reakcióprofilok a dublett PES-en. Minden energia kcal/mol-ban van megadva.

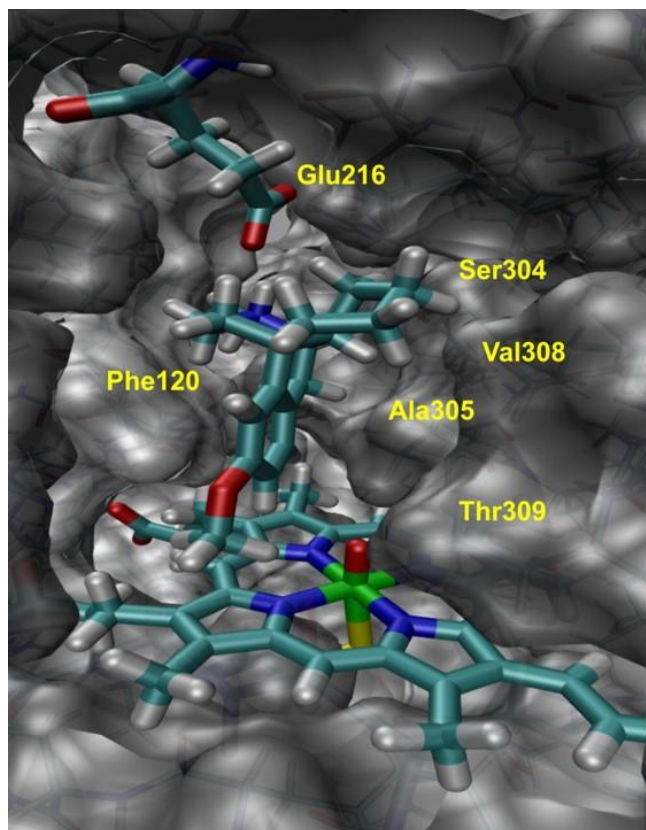


13. ábra A QM és QM/MM számításokban meghatározott átmeneti állapotok legfontosabb geometriai paramétereit és a reaktánsokhoz viszonyított relatív energiáját kcal/mol-ban.

A dextrometorfánmolekulát elhelyeztük a CYP2D6 enzim aktív helyének közelébe, majd a konfigurációs tér felderítése céljából MD szimulációkat végeztünk. Az egész szimuláció során a metoxycsoport és az aromás gyűrű is végig a ferril oxigén közelében maradt azt valószínűsítve, hogy mindkét ponton lejátszódhat a kémiai reakció.

A QM számítások és az MD szimulációk azt jelzik, hogy lehetőség van az aromás gyűrűn és a metoxycsoporton keresztül lejátszódó metabolizmusra is. A QM/MM energiaprofilok viszont ellentmondanak ennek: az aromás szén oxidációjához vezető reakció gátja sokkal magasabb (14.7 kcal/mol), mint a hidrogén-absztrakció gátja. Ennek oka az átmeneti állapotok

térszerkezetében keresendő (13. ábra). Vákuumban végzett számítások esetén ki tud alakulni az aromás szén oxidációjának kedvező térszerkezet, az enzimből ez viszont nem lehetséges: az aromás gyűrű nem tud megfelelő helyzetbe kerülni, és vonzó kölcsönhatást kialakítani a porfiringyűrűvel az aktív zseb által meghatározott térbeli kényszerek és a dextrometorfán és a fehérje oldalláncok között kialakuló hidrofób kölcsönhatások miatt (14. ábra).



14. ábra A dextrometorfán elhelyezkedése a CYP2D6 aktív helyén. A dextrometorfán protonált amincsoportja a Glu216-os oldallánccal sóhidat képez, a Phe120 π - π kölcsönhatást alakít ki a szubsztrát aromás gyűrűjével, a Ser304, Ala305, Val308 és a Thr 309 pedig jobbról határolja az aktív helyet.

A dextrometorfán metabolizmusának modellezése során nyert eredményeink arra utalnak, hogy a legegyszerűbb metabolitpredikciós módszerek nem mindig alkalmazhatóak sikerrel. A korai predikciós módszerek^{110,120} az aktivitás/közelség paradigmát tartották szem előtt, és vagy azt vizsgálták, hogy a szubsztrát mely pontjai helyezkednek el közel a vashoz (pl. dokkolási módszereknél), vagy arra fókuszáltak, hogy a szubsztrát mely részei lehetnek érzékenyek az oxidációra. Ezek a megközelítések elhanyagolják azt a szempontot, hogy az aktív hely térbeli szerkezete maga is meggátolhatja a kedvező átmeneti állapot kialakulását. Az enzimek természetes szubsztrátjai esetén ez nem szokott gond lenni, hiszen az aktív hely az

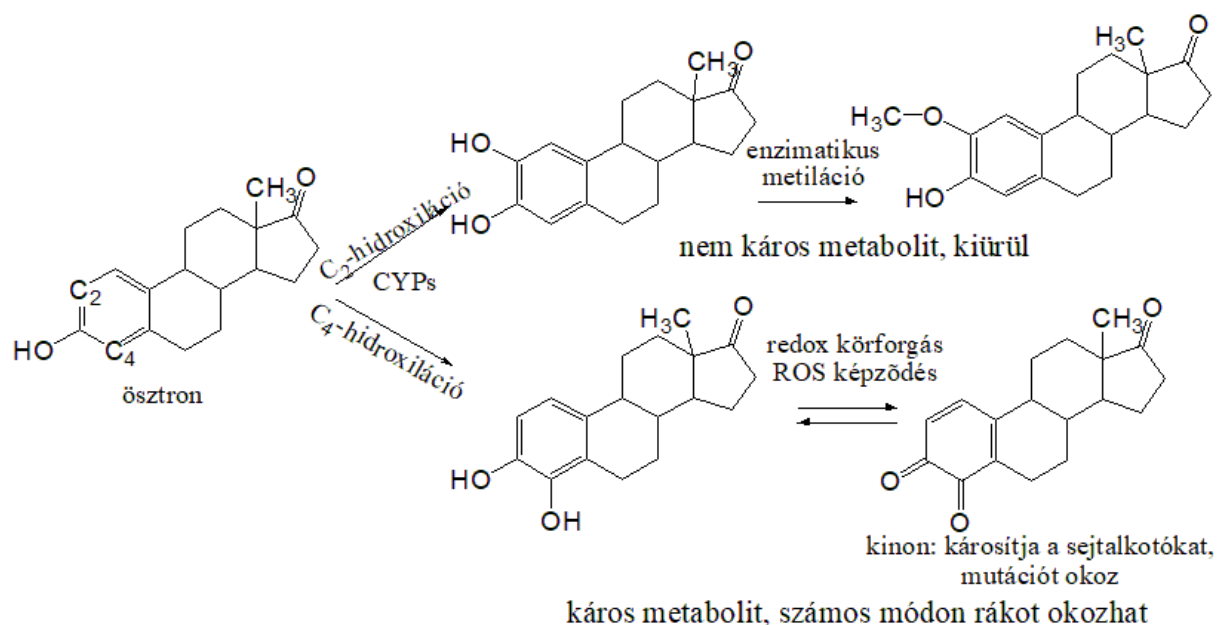
evolúció során úgy formálódott, hogy elősegítse a katalízist. Ugyanakkor nem természetes szubsztrátok (pl. gyógyszerek) esetén ezt a faktort is érdemes lenne figyelembe venni. A metabolitpredikciós módszereket lehetne finomítani azzal, hogy a dokkolt szerkezet várható reaktivitását is figyelembe vegyék. Ennek egyik lehetséges módja az lenne, hogy a releváns oxidációs út átmeneti állapotának megfelelő szerkezetet ~~pózt~~ dokkolnánk az enzim aktívhelyére. Az átmeneti állapotok modelljét pedig pl. QM vagy QM/MM tanulmányokból lehetne nyerni.

3.3. Ösztrogének metabolizmusának régiószelektivitása [D3]

Noha az ösztrogén egy létfontosságú hormon, hosszú távú vizsgálatok bizonyítják, hogy a hosszantartó, magas ösztrogénszint (természetes vagy hormonpótló terápia használata kapcsán) jelentősen megnöveli a hormonfüggő rákok, különösen a mell és a petefészek rák kialakulásának kockázatát,^{121–124} s ezt hosszútávú követéses vizsgálatok is alátámasztják.¹²⁵ Az irodalomban számos útvonalat felvetettek, amelyen keresztül az ösztrogének kifejthetik káros hatásukat. (1) Hormonális útvonal: az ösztrogének elősegítik a sejtek szaporodását, és így megnövelik a genomi mutációk számát a DNS replikáció során.^{126,127} (2) A membránhoz kötődő endoplazmatikus retikulum szabályozza a sejtregon kívüli jelátvitelt, ami szintén hozzájárulhat a karcinogenezishez.^{128,129} (3) Ösztrogének metabolitjaiból képződő redox-aktív molekulák, amelyek a sejtalkotókat károsíthatják, ide értve a katekolokat és kinonokat is.^{130,131} Ráadásul, a katekolok, kinonok és szemikinonok között kialakuló redox ciklus reaktív oxigén gyökök (ROS) keletkezéséhez vezethet, amelyek szintén károsíthatják a fehérjéket és a DNS-t is.^{132–134} A CYP enzimek felelősek az ösztrogének metabolizmusáért (és egyben bioaktivációjáért),^{135,136} és alapvetően a C₂, C₄ és a C₁₆-os szénatomjukon oxidálják őket. Mivel az utóbbi nem vezet katekol metabolithoz, és teljesen más kötődési elrendeződést igényel, mint az előbbi kettő, ezért jelen munkánkban azzal nem foglalkoztunk.

Eddigi tudásunk alapján az emberi szervezetben négy CYP enzim bontja le az ösztrogéneket: az 1A1, 1A2, 1B1 és a 3A4 izoformák, amelyek szöveti eloszlása jelentős különbségeket mutat. Az 1A1 és 1A2 izoformák a C₂-es szénatomon hidroxilálják az ösztrogén molekulát, míg az 1B1 izoforma a C₄-es szén atomon. Yamamoto és társai szerint ez az ösztrogén aktív zsebben elfoglalt eltérő orientációjából ered.¹³⁷ Ugyanakkor a szubsztrát egyes szerkezeti egységeinek hatása is befolyásolhatja a keletkező termékek arányát.^{138,139} Ez különösen igaz lehet a 3A4-es izoformára, amely a májban a legnagyobb mennyiségben

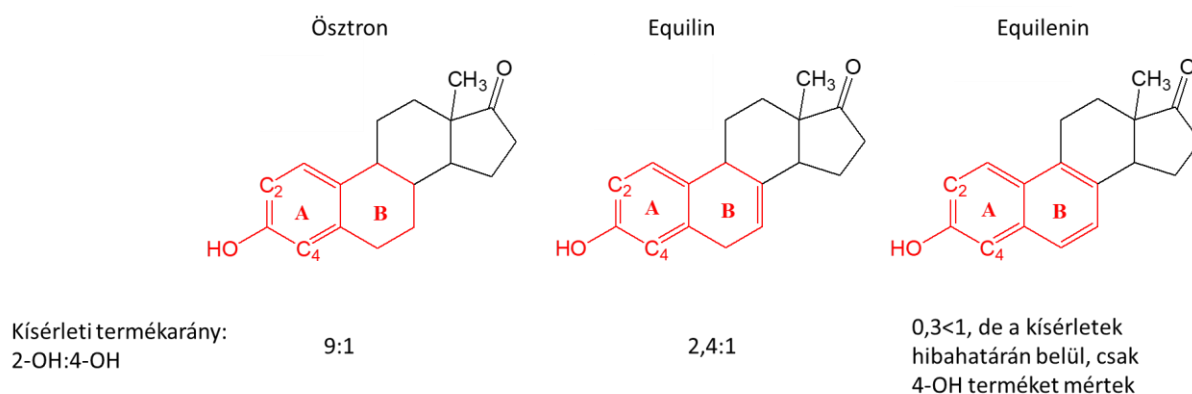
előforduló izoforma (és emiatt is a gyógyszerek körülbelül felének lebontásáért is felelős). Aktív helye nagy és apoláris, amelyben akár két gyógyszermolekula is elférhet.



15. ábra Ösztrogének metabolizmusának fontosabb útvonalai

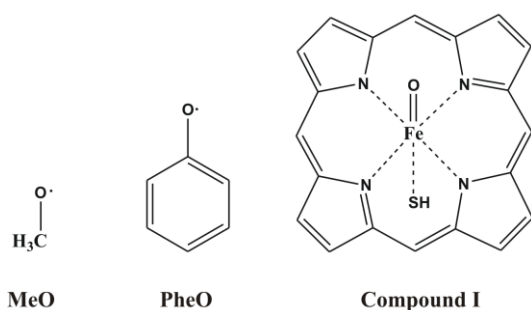
Azért fontos kérdés, hogy melyik szénatomon történik az oxidáció, mert a C₂-es hidroxiláció során keletkező katekolmolekulát a katekol-O-metil-transzferáz enzim metilálni tudja, s az így keletkező termék könnyen kiürül, és nem káros a szervezetre (15. ábra).¹⁴⁰ Ugyanez nem történik meg a C₄-es szénatomon hidroxilált termékkel, és a keletkező katekol molekula könnyen tovább tud oxidálódni kinonná, amely reakcióba lép a sejtalkotókkal; többek között a DNS-t is károsíthatja, és mutációkat okozhat, a mutációk akkumulációja pedig idővel a karcinogenezis kialakulásához vezethet.¹⁴¹ A szervezetben a katekolok (mind a 2,3- mind a 3,4-formák), kinonok és a szemikinonok közös redox ciklusban vesznek részt, amely során reaktív oxigén gyökök (alapvetően szuperoxidgyökök) keletkeznek, amelyek szintén károsítják a sejtalkotókat.

Az ösztrogének káros hatásának további kérdései merülnek fel a hormonpótló terápiák (HRT) kapcsán. Amerikában a leggyakrabban alkalmazott HRT a Premarine, amelyet összetevőit vemhes lovak vizeletéből izolálják (Wyeth-Ayerst). Fontosabb összetevői között található az öszttron, az equilin és az equilenin, amelyek a szterán váz B gyűrűjének telítettségében különböznek (16. ábra). Májvizátummal végzett kísérletek alapján a B gyűrű telítettségével egyértelműen nő a C₄-hidroxilált termék aránya.¹⁴²



16. ábra Az ösztрон, equilin és equilenin szerkezete és a májlizátummal végzett kísérletek során mért termékek aránya.¹⁴² Piros szín jelzi a számítások során figyelembe vett nehézatomokat és az gyűrűkben elhelyezett A és B betűk pedig a gyűrűk elnevezését összhangban a szteroidok esetén használt elnevezésekkel.

A fentiek alapján a C₄-hidroxilált termék határozottan károsabb, mint a C₂-hidroxilált termék, ezért felmerül a kérdés, hogy a Premarin equilin és equilenin összetevője nem jelent-e nagyobb veszélyt az emberi szervezetre, mint az ösztрон, s vajon érdemes lenne-e eltávolítani a készítményből. Szerettünk volna az ösztrogének 2- és 4-hidroxilációs útjainak részleteiről többet megtudni az emberi szervezetben. Ehhez először összehasonlítottuk és összeillesztettük a fehérjék szekvenciáit (aminosavsorrendjét) bioinformatikai módszerekkel, majd dokkoltuk az ösztront a human CYP 1A1, 1A2, 1B1 és 3A4 izoformák aktív helyére, azt vizsgálva, hogy a C₂ vagy a C₄ szénatom helyezkedik el közelebb a vashoz. (A három vizsgált ösztrogénszármazék térszerkezete nagyon hasonló). Végül kvantumkémiail módszerekkel (B3LYP funkcionállal) vizsgáltuk a három ösztrogénszármazék 2- és 4-hidroxilációs útjának mechanizmusát. Az enzim Cpd I oxidáló ágensét metoxi-, fenoxigyökkel és a fentebbi munkákban is bemutatott Cpd I-gyel modelleztük (17. ábra).



17. ábra Az ösztrogének 2- és 4-hidroxilációs útjainak vizsgálatához felhasznált enzimmodellek.

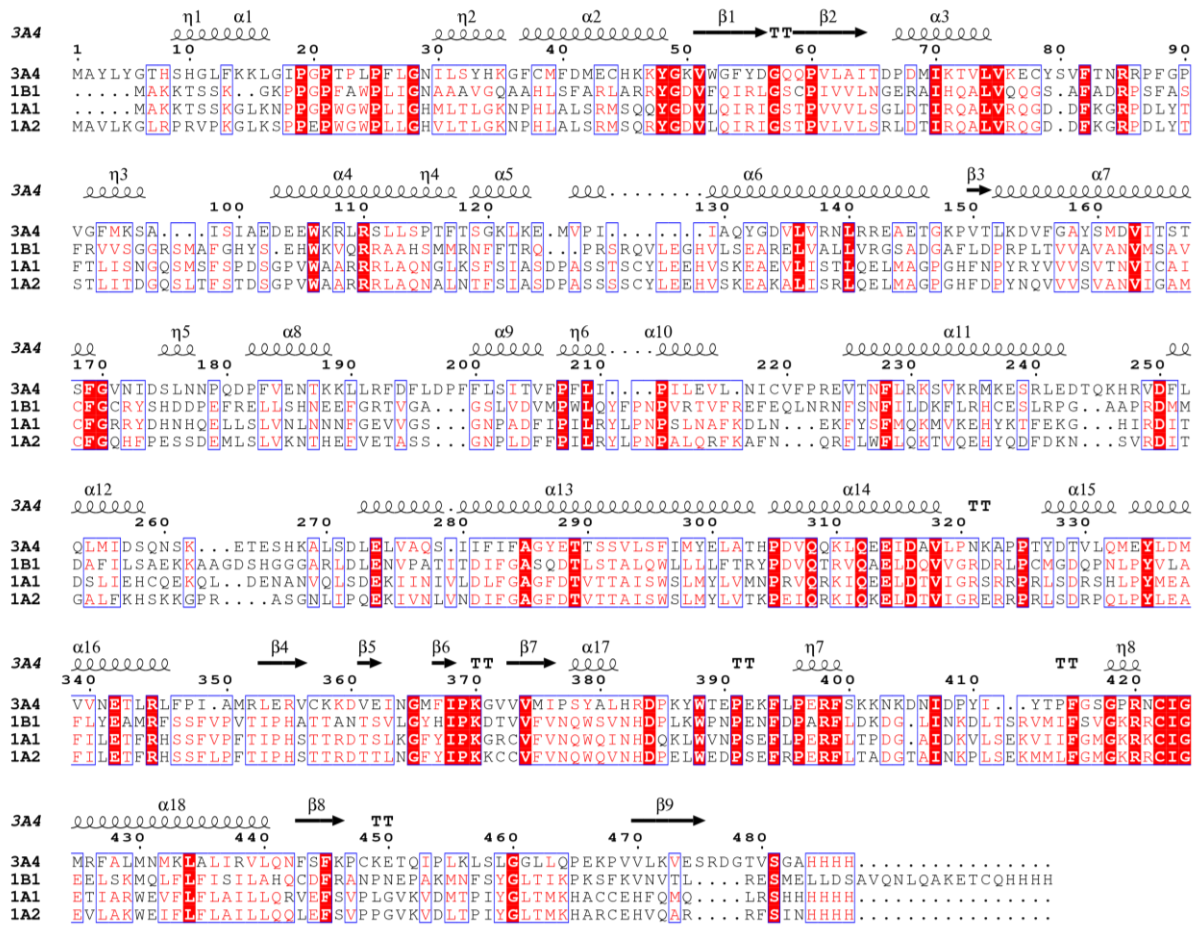
Az 2. táblázat mutatja a vizsgált CYP izoformák szekvencia százalékos identitás mátrixát (Percent Identity Matrix), amely azt fejezi ki, hogy páronként összehasonlítva milyen mértékben azonosak a szekvenciák.¹⁴³ Az 1A1 és 1A2 izoformák szekvenciaazonossága magas (70% fölött van), összhangban azzal, hogy a CYP enzimek azonos alcsaládjába (CYP1 alcsalád) tartoznak. Ez a nagyfokú azonosság a két enzim nagyon hasonló a térszerkezetére utal. Az 1B1 izoforma szekvenciája körülbelül 40%-ban azonos az 1A1 és 1A2 izoformákkal (annak megfelelően, hogy mindannyian a CYP1 családba tartoznak), míg a CYP3A4 izoforma szekvenciája csak 20%-ban azonos a többi vizsgált fehérje aminosavsorrendjével.

2. táblázat. A vizsgált négy CYP izoforma szekvenciaazonosságát jelző identitás mátrix (százalékban), amelyet a Clustal 2.1 programmal határoztunk meg.^{144–146}

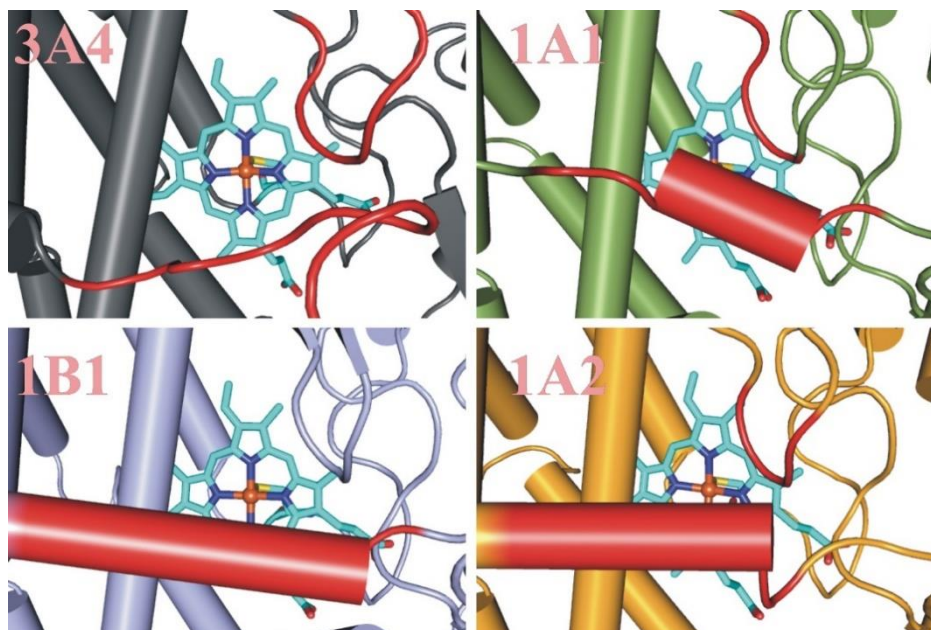
	3A4	1B1	1A1	1A2
3A4	100.0	21.0	22.3	22.6
1B1	21.0	100.0	40.8	38.7
1A1	22.3	40.8	100.0	72.2
1A2	22.6	38.7	72.2	100.0

A 18. ábra mutatja az összeillesztett szekvenciákat. A szekvenciaillesztés segítségével megtalálhatjuk azokat az aminosav oldalláncokat, amelyek azonos, vagy hasonló kémiai reaktivitással bírnak a különböző fehérjékben, és így felderíthetjük a fontos szerkezeti és funkcionális elemeket, amelyek az evolúció során konzerválódtak. A lehető legjobb illeszkedés megtalálása érdekében gyakran hézagokat is felhasználnak.

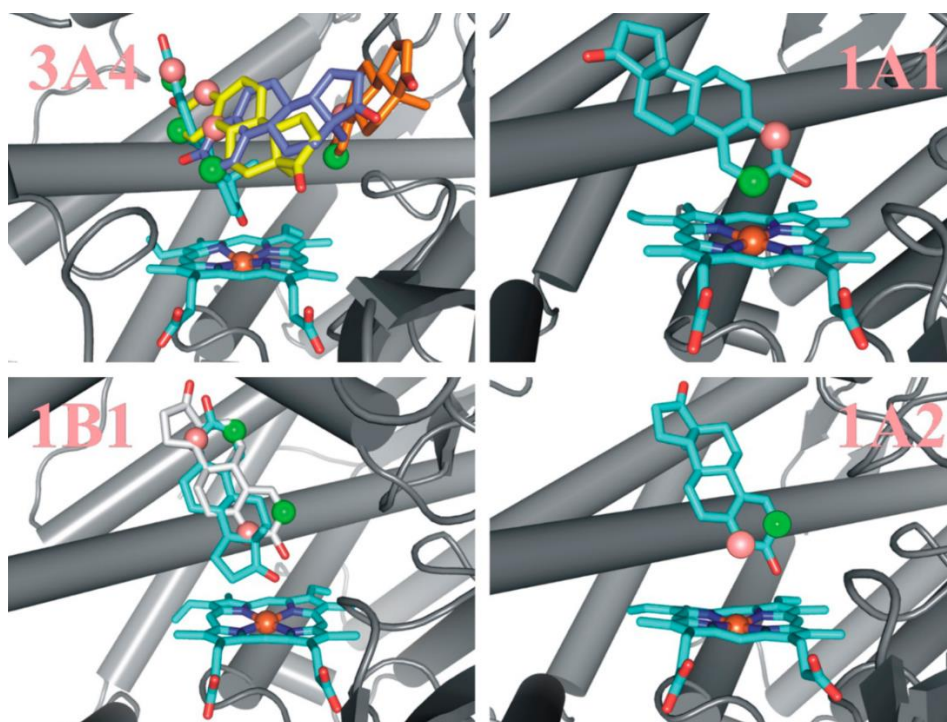
Annak ellenére, hogy a négy izoforma szekvenciája meglehetősen különbözik, az aktív helyet körülölelő szerkezeti elemek mégis hasonlóak: α -hélixek és hurkok (19. ábra). A legfontosabb különbség az, hogy a CYP1 izoformák aktív helyének méretét egy hemcsoporttal párhuzamosan elhelyezkedő α -hélix lecsökkenti a CYP3A4-hez képest. A POCASA 1.1 webserver¹⁴⁷ segítségével megbecsültük az üreg méreteket: CYP3A4: $1212 \pm 489 \text{ \AA}^3$ (16 X-Ray szerkezetből számított átlagos térfogat) CYP1A1: 332 \AA^3 , CYP1A2: 377 \AA^3 és CYP1B1: 384 \AA^3 . A nagy üregméretbeli különbség magyarázhatja azt, hogy a CYP3A4 enzim jóval többféle szubsztrát lebontására képes, mint a CYP1 család tagjai.



18. ábra CYP 3A4, 1B1, 1A1 és 1A2 izoformáinak összeillesztett szekvenciái. Az aminosavak számozása és a másodlagos szerkezeti elemek is a CYP3A4-nek felelnek meg. Hurkok: (α -hélixek), nyilak: (β -redő), TT (szigorú β -kanyar) és TTT (szigorú α -kanyar). Az ábrát a ESPript 3.0 programmal hoztuk létre.¹⁴⁸ A szekvenciaillesztésnél a fehérkaraktert tartalmazó piros dobozok szigorú azonosságot és a fehér dobozban piros karakterek hasonló aminosavakat jeleznek.



19. ábra A vizsgált CYP izoformák aktív helyének szerkezete. Az α -hélixeket hengerekkel, a hurkokat pedig zsinórokkal jelöltük. A pirossal jelölt szerkezeti elemek szűkítik a CYP1 izoformák aktív helyét. Hemcsoport pálcikákkal jelöltem: világoskék: szén, sötétkék: nitrogén, vörös: vas, sárga: kén.



20. ábra Az ösztronmolekula Autodock Vinával meghatározott legfontosabb kötődési pozíciói a vizsgált négy CYP izoformában. A zöld gömb a C_2 -es, a rózsaszín gömb a C_4 -es szén atomot jelzi az 1A1, 1B1 és 3A4 ioforma esetén. Az 1A2 izoforma esetében a zöld gömb jelzi a C_2 -es és a rózsaszín gömb jelzi a C_4 -es szén atomot.

Gázfázisú számítások segítségével megvizsgáltuk a C₂- és C₄-hidroxiláció aktiválási energiáját. A **B** gyűrű (a gyűrűk elnevezését a 16. ábra mutatja) telítetlenségének növekedésével a C₂-hidroxiláció gátja jelentősen megemelkedik, s ez vezet a C₄-hidroxilált termék túlsúlyához (3. táblázat). A két metabolikus út számított gátjai és a kísérleti termékarányokból az Arrhenius-egyenlet segítségével számított gátkülönbségek esetén nemcsak a trend egyezik meg, hanem szinte kvantitatív egyezést is találunk. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy a DFT ennyire pontosan leírja ezeket a rendszereket, inkább arra utal, hogy a módszer a vizsgált rendszerek esetében hasonló hibát vét, és a hibakioltás miatt vannak a számított különbségek ennyire jó összhangban a kísérleti adatokkal.

3. táblázat: Ösztron, equilin és equilenin esetén CYP enzim által katalizált C₂-es és C₄-es hidroxiláció során mért termék arányok, ebből számítható aktiválási energiakülönbségek, valamint a számított aktiválási energiák, aktiválási energiakülönbségek és a nukleofil támadásra vonatkozó Fukui index. Minden energia és energiakülönbség kcal/mol-ban van megadva.

	ösztron	equilin	equilenin
Kísérlet			
mért termék arány (2-OH:4-OH)	9:1	2,4:1	0.3<1 ^b
$\Delta E^{\#}_2 - \Delta E^{\#}_4$ ^a	-1,3	-0,5	>0,8
Számítás (B3LYP/6-311+G* +ZPE +D3 diszperzió korrekció szinten)			
Számított aktiválási energiák ($\Delta E^{\#}_2 / \Delta E^{\#}_4$)	10,8/9,4	12,5/11,1	15,5/11,4
$\Delta E^{\#}_2 - \Delta E^{\#}_4$	1,4	1,4	4,1
f_A^- (C ₂ /C ₄)	0,096/0,045	0,082/0,040	0,006/0,154

^a A mért termék arányból¹⁴² az Arrhenius egyenlet alapján megbecsülve ^b a mérés hibahatárán belül csak 4-hidroxilált terméket találtak

Meghatároztuk a szubsztrátmolekulák szénatomjainak a nukleofil támadásra vonatkozó Fukui indexét(f_A^-),¹⁴⁹ amely azt hivatott megjósolni, hogy az adott szénatom mennyire hajlamos elektrofil ágensekkel reakcióba lépni. A nukleofil támadásra vonatkozó Fukui index kiszámításának módja:

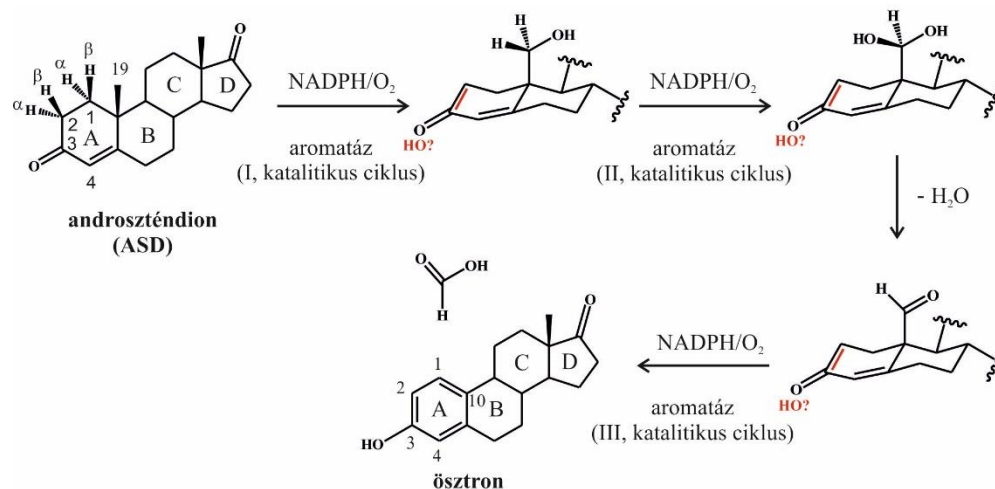
$$f_A^- = q_{A,N_0} - q_{A,N_0-1} \quad (6)$$

ahol q_{A,N_0} a semleges töltésű rendszerben az A atom töltése, és q_{A,N_0-1} a semleges töltésű rendszer geometriáján számítva az egyszerűen pozitív töltésű kationban az A atom töltése. Minél érzékenyebb a molekulán belül egy adott atom egy elektron elvételére, annál valószínűbb ott egy elektrofil ágens támadása. A Fukui indexek azt mutatják összhangban a kísérletileg mért termékarányokkal, hogy amíg az ösztroon esetében a C₂-es szénatom egy picivel nukleofilabb, mint a C₄-es szénatom, addig az equilenin esetén a C₄-es szénatom egyértelműen készségesebben reagál elektrofil ágensekkel, mint a C₂-es szénatom.

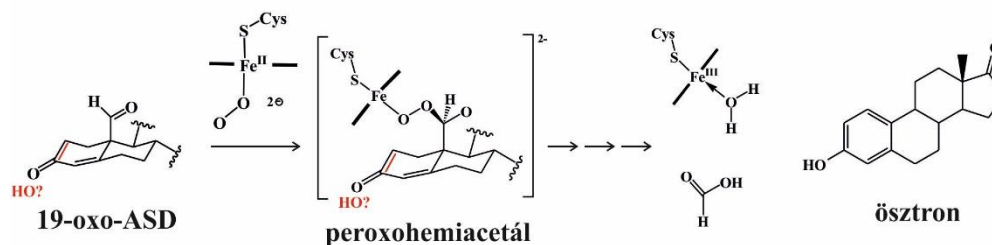
3.4. A humán aromatáz (P450arom) enzimreakció mechanizmusának felderítése [D4-D5]

Az CYP enzimek nemcsak az ösztrogének bioaktivációja kapcsán kapcsolódnak a mellrák kialakulásához. A humán aromatáz (P450arom) enzim különleges funkcióval bír az emberi szervezetben: katalizálja az ösztrogén bioszintézis utolsó lépését, és ezáltal közvetlen hatással van az ösztrogének szintjére a vérben. Sebészetileg kezelt mellrákos pácienseknek aromatázinhibitorot adnak, hogy az ösztrogénszintet alacsonyan tartsák, és a mellrák kiújulását megakadályozzák.⁹¹ Noha jelentős kereslet van aromatáz inhibitorokra, még nincs általános megegyezés az enzim által katalizált különleges reakció mechanizmusát illetően, nem tudjuk, hogyan képes az enzim az androsztendion A gyűrűjét aromatizálni, amely 3 katalitikus cikluson keresztül megy végbe. (21. ábra).

Amíg az I. és II. katalitikus lépésben – az általánosan elfogadott elmélet szerint – a C₁₉ atomot tartalmazó metilcsoport a Groves és McClusky által javasolt hidrogénygyök lehasadásából és hidroxilgyök visszakötődéséből álló mechanizmus¹⁵⁰ szerint oxidálódik, addig a III. ciklus mechanizmusának részletei nem tisztáztak. Az utóbbi harminc év munkái alapján leginkább a peroxohemiacetálon át vezető mechanizmus tűnt a legvalószínűbbnek (22. ábra), viszont újabb mérések¹⁵¹ (rezonancia Raman spektroszkópia, KSIE (kinetikus másodlagos izotóp effektus)) ezt cáfolják, és egyértelműen a Cpd I oxidáló ágens szerepét jelezték ebben a katalitikus ciklusban is.



21. ábra Az aromatáz enzim teljes katalitikus ciklusa, amely három általános katalitikus ciklusból áll. A három közti termékénél a piros szín az alternatív enolizált forma szerkezetét jelzi.

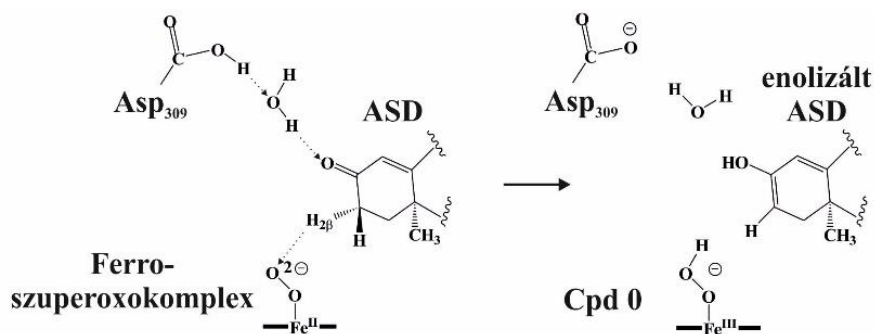


22. ábra A harmadik katalitikus ciklus általánosan elfogadott mechanizmusa: deformiláció peroxohemiacetál keletkezésén keresztül. A három közti termékénél a piros szín az alternatív enolizált forma szerkezetét jelzi.

Egy olyan reakciómechanizmust kerestünk az aromatáz enzim esetén, amely összhangban van a jelenleg ismert összes kísérleti ténnyel: (1) az 1 β - és 2 β -hidrogének szelektív eliminációja^{152,153}, (2) ferro-szuperokomplex megnövekedett stabilitása más izoformákhoz képest¹⁵⁴ (3) Cpd I képződése a harmadik katalitikus ciklusban¹⁵¹. Munkánkhoz QM és QM/MM számításokat és MD szimulációkat használtunk. A QM/MM s számításokhoz számos különféle QM régiót használtunk, hogy azonosítani tudjuk a katalízisben szerepet játszó legfontosabb oldalláncokat és az enolizáció lehetséges protonforrását.

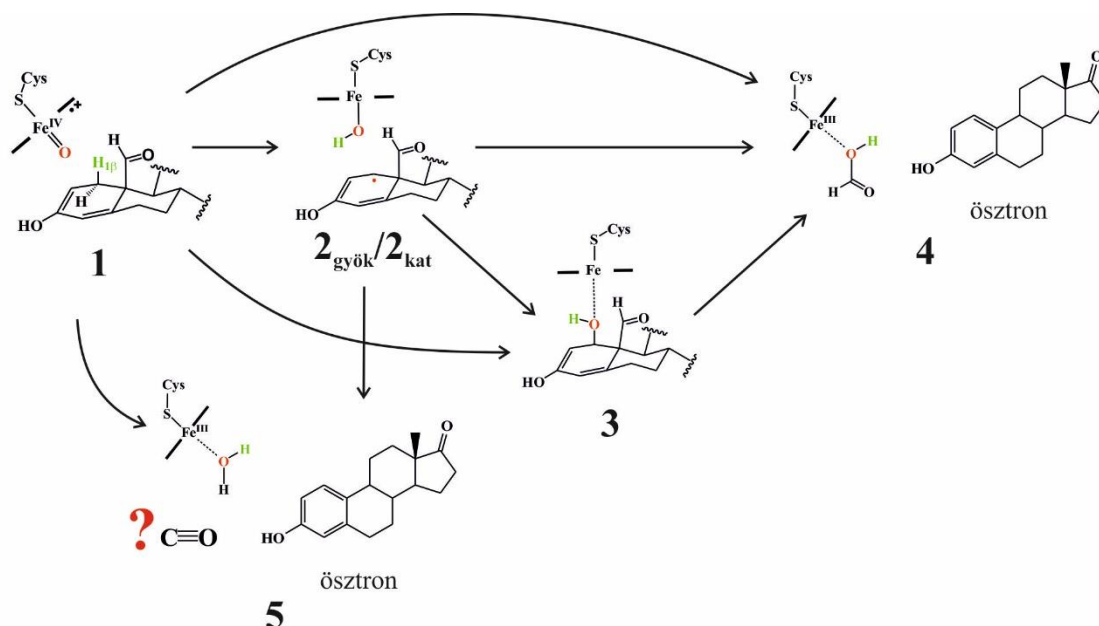
A 21. ábra és a 22. ábra képleteiben a pirossal jelölt részek arra utalnak, hogy valahol a mechanizmusban a szubsztrátmolekula enzimmatalizált enolizációjának is helyet kell kapnia. Ennek lehetőségét tanulmányozva jutottunk arra az ötletre, hogy az enolizáció összekapcsolódhat a ferro-szuperokomplex protonálódásával, a legkedvezőbb elrendeződéshez tartozó átalakulást a 23. ábra mutatja. A javasolt mechanizmus összhangban van a kísérleti megfigyelésekkel, miszerint a 2 β -helyzetű hidrogén lehasadása szelektíven

történik meg. A számított energiagátak valamelyest magasabbak, mint a P450cam esetében mások által meghatározott értékek¹⁵⁵ (kb. 5-7 kcal/mol szemben a 1,2-2,5 kcal/mol-lal), ami szintén megfelel a ferro-szuperoxokomplex hosszabb élettartamára utaló tapasztalatoknak a P450arom-ban. Megmutattuk azt is, hogy a C₁₉ atomot tartalmazó csoport minősége kis hatással van az enolizáció gátjára, ezért az a három katalitikus ciklus bármelyikében megvalósulhat.



23. ábra Az ASD enzimkatalizált enolizációja

Munkánk következő fázisában azt vizsgáltuk meg, hogy a Cpd I forma hogyan tudja úgy oxidálni az enolizált 19-oxo-ASD szubsztrátot a 3. katalitikus ciklusban, hogy a C₁₀-C₁₉ kötés elhasadjon, és ösztron termék keletkezzen. Számos reakcióút elképzelhető, amelyeket a 24. ábra mutat be. A gázfázisú és a komplexebb QM/MM számítások egyaránt megerősítették, hogy az enolizálódott 19-oxo-ASD deformilációja és ezáltal aromatizációja a Cpd I (esetleg Cpd II) komplex által energetikailag kedvező folyamatban valósulhat meg. Mivel végeredményben az összes reakcióút az ösztron képződéséhez vezet, hasonlóan az irodalomban leginkább elfogadott peroxohemiacetál intermediert tartalmazó mechanizmushoz (22. ábra), érthető a humán aromáz nagyfokú szelektivitása a teljes enzimkatalízis végtermékét illetően.



24. ábra A C₁₀-C₁₉ kötés hasadásának lehetséges módjai a harmadik katalitikus ciklusban. Az kísérletekben eddig mindig öszttron és hangyasav terméket figyeltek meg (4), de számításaink alapján CO is képződhet kis mennyiségben.

A DFT és QM/MM számítások közötti legjelentősebb eltérés a kiindulási szerkezet és az 1 β -hidrogén eliminációja során keletkező köztitermék elektronszerkezetében figyeltük meg. Amíg a gázfázisú számítások egyértelműen Cpd I típusú oxidáló ágenszt és gyökös mechanizmusú reakciót jósoltak, addig az enzimkörnyezetben az oxidálószer egyfajta átmenetet képviselt a Cpd I és Cpd II között, és az 1 β -hidrogén lehasítása során egyértelműen kationos konfigurációjú intermedier keletkezett. Ebben leginkább a vas-porfirin komplex és a ligandum relatív pozíciója játszik fontos szerepet, de a FeO részhez hidrogénhíddal kapcsolódó vízmolekula is szignifikánsan befolyásolta az oxidáló ágens spinsűrűségét, fokozva ezzel annak Cpd II karakterét.

Számításaink alapján érdemes lenne kísérletileg szén-monoxid nyomait keresni a humán aromataz katalizálta kémiai átalakulás termékei között, mert hangyasav mellett kis mennyiségben annak képződése is várható.

4. Gázmolekulák kölcsönhatása a hemcsoporttal

Az előző fejezetben CYP enzimek reakcióinak mechanizmusával foglalkoztunk, s láttuk, a Cpd I intermedier kulcsszerepét a reakcióban. A hemcsoport nemcsak oxigén, hanem más gázmolekulák, pl. szén-monoxid és nitrogén-monoxid megkötésére is képes. Korábban ezeket a vegyületeket egyértelműen mérgeknek tekintették, mert erősen kötődnek különösen a Fe(II)-ionot tartalmazó hemcsoportokhoz (de a Fe(III)-hoz is), gátolva azok aktivitását, többek között a hemoglobin által történő oxigén szállítást, és a terminális oxidációt.

Az utóbbi közel fél évszázadban egyre jobban megértjük a CO és NO fiziológiai szerepét,¹⁵⁶⁻¹⁶⁰ és a kutatások betekintést engednek metalloproteinekkel¹⁶¹ és átmenetifém-komplexekkel¹⁶² történő kölcsönhatásukba. Amikor megkötődnek az aktív centrumban, a hemfehérje konformációja megváltozik, amely egy másodlagos jelet hoz létre, további változásokat idézve elő és befolyásolva a sejtszintű metabolizmust.¹⁶³⁻¹⁶⁶ A NO és a CO messenger, vagyis jelátvivő molekulaként szerepet játszanak többek között az ideg-, immun- és légzőszervrendszerben, és hozzájárulnak a metabolikus hálózatok és a légzés szabályozásához is.^{156,163,166-168} Az oldható guanilil-cikláz (soluble guanylyl cyclase, sGC)^{169,170} az emberi szervezet egyetlen nitrogén-monoxid-receptora, s fontos szabályozó fehérje. A szabályozó rendszer meghibásodása számos kórképhez, többek között kardiovaszkuláris, neurodegeneratív és gyulladásos betegségekhez vezethet.

Ebben a fejezetben négy témakörrel foglalkozom. Először megvizsgálom azt, hogy mennyire megbízhatóan írják le a DFT módszerek a NO és Fe(II)/Fe(III)-ionokat tartalmazó hemrendszerek kölcsönhatását, majd bemutatok egy olyan különleges CYP enzimet, a P450nor-t, amely O₂ helyett NO-t köt meg. Ezután a mioglobinnal és NO/CO között lejátszódó reakciók leírására létrehozott modellel foglalkozom, amellyel a gázok diffúzióját és a spin-tiltott kémiai reakció mechanizmusát tanulmányoztuk. Végezetül összehasonlítom a gázok diffúzióját a H-NOX (hem/nitrogén-monoxid-oxigén kötő domén) fehérjékben, s arra keresem a választ, hogy alkalmasak-e ezek a rendszerek gázok transzportjára.

4.1. Nitrogén-monoxid kötődési energiájának meghatározása a hemcsoporttal DFT és magasszintű *ab initio* számítások segítségével [D6]

Az axiális ligandumok koordinációja a hemcsoporttal nemcsak biológiai szerepe¹⁷¹ miatt különösen érdekes, hanem technológiai szempontból is: lehetővé teszi, hogy alkalmazzuk őket gáz-szenzorként^{172,173} vagy katalizátorként.^{174,175} Létrehozhatunk NO-által indukálható

kapcsolókat,¹⁷⁶ s vizsgálják a szerepét rákos megbetegedések kombinált mágneses rezonanciás és fototermális terápiájában is.¹⁷⁷

Számos kísérleti és elméleti munka foglalkozott a NO és vas-porfirinek kölcsönhatásával, amely közül csak pár példát emelek itt ki. Többféle módszerrel és rendszerben vizsgálták a NO kötési entalpiáját vagy szabadentalpiáját a hemcsoporthoz, az előbbi 20-25 kcal/mol-nak,^{178,179} míg az utóbbi 6,5-16 kcal/mol^{180,181} körüli értékeknek adódott. Ezek az értékek egymással konzisztensek, hiszen az utóbbi magába foglalja entrópia hatását a $-T\Delta S$ tag révén, amely a translációs és rotációs szabadsági fokok csökkenése miatt, szinte minden esetben a komplexképződést ellen hat, s értéke körülbelül 10 kcal/mol.¹⁸²

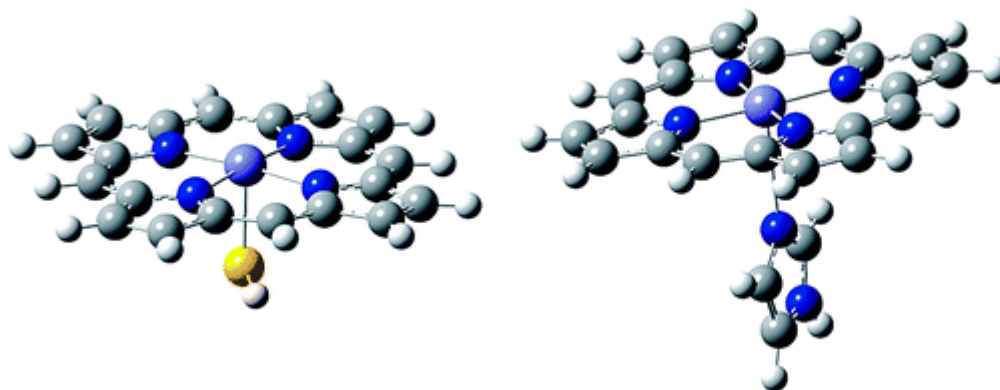
Kvantumkémia vizsgálatok lehetőséget teremtettek a gázmolekulák és hemtartalmú rendszerek/fehérjék kölcsönhatásának pontos leírására.^{8,183,184} DFT eredmények alapján a CO és O₂ kötődési energiáját a B3LYP funkcionál viszonylag pontosan adja vissza, de a NO esetén 10 kcal/mol-lal kisebb a számított érték a kísérletinél (~2 kcal/mol a ~9-13 kcal/mol helyett mioglobinnal és citokróm c oxidáz enzimekben).¹⁸⁴ A BP86 funkcionállal viszont 35 kcal/mol-os kötési energiát számítottak.¹⁸⁵ CASSCF and CASPT2 számítások is azt mutatják, hogy a NO kötődési energiájának meghatározásakor akár 20 kcal/mol-os hibát is véthet a B3LYP funkcionál.¹⁸⁶

Szerettük volna megérteni a kísérleti és a többféle elméleti módszerrel meghatározott kötési energiák közti különbségeket, s szisztematikusan megbecsülni, hogy a DFT funkcionálok mennyire írják le pontosan a NO kötődését Fe(II)- és Fe(III)-tartalmú porfirin rendszerekhez. Ehhez DFT számításokat végeztünk a FeP(SH) és FeP(Im) (25. ábra) porfirinrendszereken, valamint ezek egyszerűsített modelljein (26. ábra). Ha az axiális ligandum SH, akkor a vasion oxidáció foka +3, míg ammónia axiális ligandum esetén +2. A modellrendszereken a CCSD(T) számításokat nagy bázissal végeztük, hogy minél pontosabban meg tudjuk határozni a NO kötési energiáját.

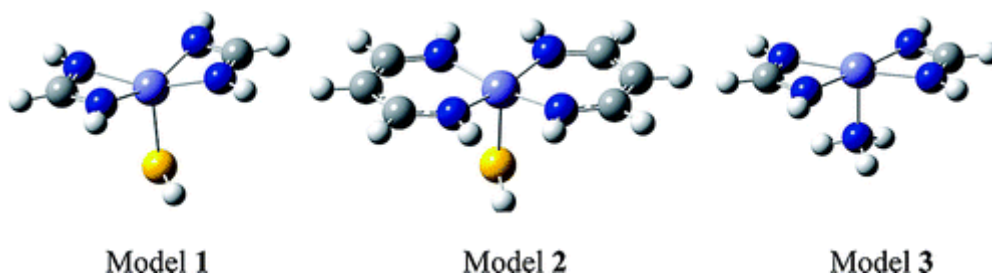
Számítási módszerek

Mivel célunk a módszerek teljesítőképességének validálása volt, ezért a disszertációban szereplő többi tanulmánnyal ellentétben itt részletesen bemutatom a felhasznált protokollt. A DFT számításokat a Jaguar 06 programcsomaggal végeztük.¹⁸⁷ A geometriákat a B3PW91 funkcionállal optimáltuk a BS1 báziskészlet kombinációval (Fe: Los Alamos ECP + lacv3p tripla-zéta minőségű báziskészlet, többi atom: 6-31G*báziskészlet). Számos funkcionállal végeztünk single-point energiaszámításokat, amely közül itt a BP86 tiszta GGA funkcionállal, valamint a B3LYP és B3PW91 hibrid funkcionálokkal számított eredményeket mutatom be. (A

megjelent közlemény Supporting információjában további funkciókkal számított eredmények is megtalálhatóak.) A számításokhoz spinállapottól függően az RKS vagy az ROKS formalizmust használtuk. Azért, hogy a modellrendszerekben megmaradjon az amidinligandumok porfingyűrűre emlékeztető sík szerkezete, a geometria optimalizálás során az atomokat egy síkban tartottuk, s megőriztük a rendszerek C_s szimmetriáját.



25. ábra $FeP(SH)$ és $FeP(Im)$ szerkezete (sötétkék: nitrogén, világoskék: vas, szürke: szén, fehér: hidrogén, sárga: kén)



26. ábra Modell rendszerek szerkezete (sötétkék: nitrogén, világoskék: vas, szürke: szén, fehér: hidrogén, sárga: kén)

A CCSD(T) számításokhoz a MOLPRO 2002.3 programcsomagot használtuk.¹⁸⁸ A skaláris relativisztikus hatások figyelembevételéhez az egyelektron integrálokat a Douglas-Kroll-Hess formalizmussal számítottuk, és a cc-pVDZ, cc-pVTZ, cc-pVQZ bázisok¹⁸⁹ DKH-formalizmus használatához rekontrahált verziójukat alkalmaztuk a C, H, N és S atomokon, míg a vason a Balanov és Peterson által javasolt és DKH módszerhez adaptált cc-pVTZ és cc-pVQZ báziskészleteket.¹⁹⁰ Mivel a számítások nagyon erőforrás igényesek voltak, a vegyületeket két részre osztottuk: a vascentrumon és a NO ligandumon (ha jelen volt) a nagyobb méretű cc-pVTZ vagy cc-pVQZ bázis készletet használtuk, míg a többi atomon a cc-pVDZ vagy cc-pVTZ báziskészletet. Ezt a megoldást már korábban is használták,¹⁹¹ de itt is megvizsgáltuk annak hatását, hogy az amidin- valamint az SH/ NH_3 ligandumokat kisebb báziskészlettel írtuk le.

A végtelen báziskészletre történő extrapolációhoz felhasználtuk, hogy Helgaker szerint a korrelációs energia maradványa $1/X^3$ függvény szerint függ a báziskészlet méretétől (ahol $X=2$ dupla-zéta, $X=3$ tripla-zéta, $X=4$ négyszeres-zéta báziskészlet esetén).¹⁹²

$$E_{\infty} = E_{\text{HF/cc-pVQZ}} + \frac{64}{37} * E_{\text{correl/cc-pVQZ}} - \frac{27}{37} E_{\text{correl/cc-pVTZ}} \quad (7)$$

Ezekben a számításokban az amidinligandumon és az axiális SH-csoporton cc-pVDZ bázist alkalmaztunk. A CCSD és CCSD(T) számításokban a NO kötési energiáját a báziskészlet szuperpozíciós hiba (BSSE) korrigálására szolgáló *counterpoise* korrekció figyelembevételével is meghatároztuk.

Mivel a HF hullámfüggvény használata esetén sok esetben a csatolt-klaszter egyenletek nem konvergáltak, ezért a sorfejtést a B3LYP funkcionállal meghatározott Kohn-Sham referencia pályák segítségével végeztük el. Így minden esetben elértük a konvergenciát és kisebb egyszeres gerjesztésekhez tartozó gerjesztési amplitúdókat kaptunk.³⁰ Ezért a táblázatokban szereplő HF energia, nem a valódi HF energia, hanem a KS referenciadetermináns energiája. A bemutatott energiák nem tartalmazzák a zérus ponti rezgési energiát (modellrendszerekre nem is lett volna értelme frekvenciaszámítást végezni, hiszen mesterségesen egy síkba kényszerítettük az amidinligandumok atomjait). A zérus pont rezgési energia hatása a spinállapotok felhasadására kicsi, míg a NO kötési energiáját várhatóan 1-2 kcal/mol-lal csökkenti.

Eredmények

Először a DFT számításokkal kapott eredményeket (4. táblázat) tárgyalom a teljes porfinrendszerek, majd a modellvegyületek esetén, s ezt fogja követni a CCSD(T) eredmények bemutatása.

Az FeP(Im) rendszer alapállapota B3PW91 funkcionállal számítva kvintett, B3LYP-pel pedig tripllett. Mindkét módszer szerint a szinglett állapot energiája jóval magasabb a kvintett/tripllett állapot energiájánál. A hibrid funkcionálokkal ellentétben a BP86 szinglett állapotot jósol, ez a megfigyelés összhangban van azzal, hogy a tiszta funkcionálok a kisspinű, míg a hibridfunkcionálok a nagyspinű állapotokat stabilizálják jobban.¹⁴

Az FeP(SH) rendszer alapállapota szextett a B3PW91 és B3LYP eredmények alapján, ugyanakkor a legalacsonyabban fekvő dublett és kvartett állapotok energiája csak alig magasabb a szextett állapoténál.

Korábbi eredmények alapján a NO a nitrogénatomon keresztül köt a vasionhoz,¹⁸⁴ mi is csak ezt a kötődési módot vizsgáltuk, és csak a legalacsonyabb energiájú állapotot: FeP(SH) esetén a szingulettet, míg FeP(Im) esetén a dublettet. A hibrid funkcionálok minden esetben a kísérleti értékeknél jóval kisebb kötési energiát jósolnak: FeP(SH) esetén 4 kcal/mol-t (B3PW91) és 2,7 kcal/mol-t (B3LYP), míg FeP(Im) esetén 10 kcal/mol-lal magasabb értékeket: 11,7 kcal/mol-t (B3PW91) and 14,1 kcal/mol-t (B3LYP). Ezek az értékek kifejezetten alacsonyabbak a fent említett 20-25 kcal/mol-os kísérletileg meghatározott értékeknél.^{178,179} Ezzel szemben a tiszta BP86 funkcionál 50 kcal/mol kötési energiát jósol, ennek értelmezésekor viszont fontos észrevenni, hogy a BP86 rosszul jósolja meg az ötöskoordináció vasfragmentumok alapállapotának spinállapotát.

4. táblázat: A vizsgált komplexek és modellvegyületek, valamint NO komplexeiknek relatív energiája DFT/BSI szinten

	rendszer	B3PW91	B3LYP	BP86
FeP(SH)	² [Fe]	4,8	1,6	-15,2
	⁴ [Fe]	4,4	1,6	-8,0
	⁶ [Fe]	0,0	0,0	0,0
	¹ [Fe-NO] ^a	-4,0	-2,7	-49,1
FeP(Im)	¹ [Fe]	9,0	4,3	-12,9
	³ [Fe]	2,5	-0,5	-10,5
	⁵ [Fe] ^b	0,0	0,0	0,0
	² [Fe-NO] ^a	-11,7	-14,1	-50,8
Model 1	² [Fe]	26,4	22,8	10,3
	⁴ [Fe]	9,3	7,2	-2,1
	⁶ [Fe]	0,0	0,0	0
	¹ [Fe-NO] ^a	5,5	6,7	-38,7
Model 2	² [Fe]	-5,2	-7,0	-28,4
	⁴ [Fe]	-2,3	-4,2	-14,3
	⁶ [Fe]	0,0	0,0	0,0
	¹ [Fe-NO] ^a	-2,5	-0,5	-48,3
Model 3	² [Fe]	30,9	25,1	14,8
	⁴ [Fe]	14,8	12,0	2,0
	⁶ [Fe]	0,0	0,0	0,0
	¹ [Fe-NO] ^a	1,4	-0,2	-40,2

^aA komplex relatív energiáját a szeparált nagyspinű vas komplexhez és NO ligandumhoz képest számítottuk ki, ^b 5A' állapotban számítva.

Mivel a porfinrendszerek túl nagyok voltak ahhoz, hogy CCSD(T) számításokat végezzünk rajtuk, olyan modellrendszereket kerestünk, amelyekre CCSD(T) számítások elvégezhetőek, s a lehető legjobban visszaadják a központi vasion koordinációját a

porfingyűrűben (26. ábra). Ehhez két kelátképző nitrogéntartalmú ligandumot használtunk, amelyekben a nitrogének töltése és kötődési módja ugyanolyan, mint a porfingyűrűben, ugyanakkor a kiterjedt aromás rendszer helyett két kisebb gyűrűt tartalmaznak. Mindegyik rendszert C_s pontcsoportban vizsgáltuk, és az amidincsoportok C, N és H atomjait egy síkba kényszerítettük, utánozva a porfirin gyűrű sík szerkezetét.

A két kisebb modellrendszer esetén a hibrid funkcionálok nagyon erőteljesen a nagyspinű állapotot preferálják. Fontos észrevenni, hogy a model **1** és **3**-ban két nagyon eltérő NFeN szög mérhető (113° és 67°), szemben a porfirin rendszerrel, ahol a kötésszögek mind 90 fokosak, s amelyet a model **2** rendszer már jól visszaad (88.6° and 90.2°). Ennek megfelelően a model **2** rendszerben számított spinállapot felhasadások már jóval kisebbek hasonlóan az FeP(SH) rendszerhez, bár alapállapota dublett, hibridállapotokkal számítva, szextett helyett. Mindegyik rendszerben megfigyelhető, hogy a BP86 funkcionál növeli a kisspinű állapot stabilitását, és szignifikánsan nagyobb NO kötési energiát jósol a hibrid funkcionálokhoz képest. A model **1** esetén a hibrid funkcionálok szerint a NO adduct képződése endoterm, s közel termoneutrális a model **2** és **3** esetén. Az, hogy a model **2** esetében a három funkcionállal számított kötési energia értékek jó összhangban vannak az FeP(SH) rendszerre számított mennyiségekkel mutatja, hogy ez a rendszer már valóban alkalmas az FeP(SH) modellezésére, és elektronszerkezetük is hasonló.

A CCSD(T) értékek tanulmányozása előtt érdemes megjegyezni, hogy pontosságuk főcsoportbeli elemeket tartalmazó, egy determinánssal leírható rendszerek esetén $1-3$ kcal/mol. Ezzel szemben átmenetifémet tartalmazó vegyületek esetén fel szokott merülni, hogy a CCSD(T) módszerek nem megbízhatóak, mert a kétszeresen betöltött d pályák és a gyenge fém-ligandum kölcsönhatások leírása gyakran igényel multireferenciás módszereket. Azáltal viszont, hogy a CCSD(T) módszer a háromszoros gerjesztések egy részét figyelembe veszi, mégis gyakran jó leírást ad egyreferenciás-multireferenciás esetek határán is. A T2 amplitúdók vizsgálata információt szolgáltat arról, hogy a CCSD(T) számítások eredményei mennyire megbízhatóak. A NO-komplexek esetén kaptuk a legnagyobb amplitúdókat, $0,1$ körüli értéket, amely viszont jóval kisebb, mint a MgO és O_3 rendszerekre számított $0,2-0,3$, amelyek jól leírhatóak CCSD(T)-vel.¹⁹³

Ahhoz, hogy pontos CCSD(T) eredményeket kapjunk nagy báziskészletet kell alkalmazni, de a rendszerek mérete miatt nem tudtuk ezt megtenni. Ehelyett, ahogy fent ismertettem a központi vasionon és a NO ligandumon nagyobb bázist (TZ vagy QZ minőségűt) használtunk, míg az amidin ligandumon és az axiális SH/NH₃ ligandumokon csak DZ minőségűt. A model **1**-en ellenőrzésként elvégeztük a számításokat úgy, hogy minden atomon

TZ minőségű bázist használtunk, s a kapott eredmények megerősítették, hogy fontos a nagyobb bázis alkalmazása a vason és a NO ligandumon, de az amidinligandumokon használt bázis mérete csak kevésbé befolyásolja az eredményeket, így a kompromisszum elfogadható (5. táblázat).

A végtelen bázisra extrapolált CCSD(T) eredmények alapján a model **1** és **3** alapállata kvintett, és a model **2** esetén a három spin állapot közel esik egymáshoz, jelezve, hogy a hibrid funkcionálok sokkal jobb becslést adnak a spinállapotok felhasadására, mint a BP86, amely kb. 20 kcal/mol-lal túlstabilizálja a kis- és közepesspinű állapotokat a nagyspinű állapothoz képest. A B3PW91 funkcionállal értük el a legjobb eredményeket: minden esetben kevesebb mint 4 kcal/mol az eltérés a CCSD(T) értékekhez képest.

A NO kötési energiáinak összehasonlítása során mindig a nagyspinű komplexhez képest fogom a számokat tárgyalni elősegítve az összehasonlítást teljes porfinrendszerekkel. A model **2** rendszer esetén nem tudtuk elvégezni a számításokat a QZ bázissal, így a végtelen bázisra extrapolált értékeket csak a két kisebb modellre mutatja az 5. táblázat. A bázis méretének növelése a Fe-NO fragmenszen TZ-ről QZ-re 5-6 kcal/mol-lal növeli a NO kötési energiáját, amely a CCSD(T)/cc-pV ∞ Z,cc-pVDZ szinten model **1** esetén 9,3 kcal/mol, míg model **3** esetén 12,7 kcal/mol. A BSSE korrekciót figyelembe véve ezek az értékek 4,5 és 8,3 kcal/mol-ra csökkennek. A model **2** esetén hasonló mértékű BSSE korrekciót figyelembe véve a NO kötési energiája nagyjából 16 kcal/mol lenne. Összességében a három modellvegyület esetén a B3PW91 funkcionállal számított értékek (-5,5, 2,5, és -1,4) nagyjából 10 kcal/mol-lal alacsonyabbak a CCSD(T) értékeknél.

Ez a 10 kcal/mol-os energiakülönbség felhasználható a teljes porfin rendszerekre számított NO-kötési energiák korrigálására. Így a FeP(SH) és FeP(Im) modellek esetén nagyságrendileg 15 és 20 kcal/mol kötési energiát jósolhatunk, amely sokkal jobb egyezést mutat a kísérleti értékekkel (20-25 kcal/mol), mint a tisztán DFT-vel számított érték.

Érdeemes elgondolkodni azon, hogy a hibrid funkcionálok miért becslik ennyire alul a NO kötési energiáját, hiszen ez hozzájárulhat más ligandumok kötődésének megértéséhez is. Egyik oka annak, hogy a HF kicserélődési tagot bevezették a hibrid funkcionálokban az volt, hogy részlegesen kijavítsák az elektronok önkölcsönhatásából eredő hibát. Ugyanakkor, ha 100%-ban a pontos Hartree-Fock kicserélődési energiát vennénk figyelembe, mégsem jutnánk pontos eredményekre. Ez azért van, mert az önkölcsönhatásból eredő hatások nemfizikai természetük ellenére segíthetnek figyelembe venni a középtávú elektronkorrelációt, pl. a bal-jobb korrelációt egy kötő elektronpáron belül. Ezért van az, hogy a HF kicserélődési tag arányának változtatásával hangolhatjuk az önkölcsönhatásból eredő hibát és a középtávú korrelációs

hatások fontosságát. Bizonyos kémiai környezetben a B3LYP funkcionálban alkalmazott 20%-os HF kicserélődési tag nagyon kedvező hibakioltáshoz és jó eredményekhez vezet, amikor azonban a középtávú kölcsönhatások jelentősebbek, jelentősen alulbecsüli a kötési energiát.

Ennek alátámasztására a disszertáció készítése során kiszámítottam a NO kölcsönhatási energiáját az FePIII-rendszerrel B3LYP* funkcionállal is (amiben 15% a HF kicserélődési tag aránya). A NO kötési energiája a B3LYP, B3PW91 és B3LYP* funkcionálokkal számítva (def2-TZVP bázis használva minden atomon) -11,1, -12,8 és -21,3 kcal/mol-nak adódott, összhangban a fenti gondolatmenettel.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy modellrendszerek felhasználásával megvizsgáltuk a B3LYP, B3PW91 és BP86 funkcionálok pontosságát Fe(II)- és Fe(III)-iont tartalmazó hemrendszerek esetén CCSD(T) számítások segítségével. Az eredmények alapján a hibrid funkcionálok jól becsülik meg ezen rendszerek spinállapot felhasadását, de kb 10 kcal/mol-lal alulbecsülik a NO kötési energiáját. Valószínűsíthetően ennek oka, hogy az átlagosnál jelentősebb a NO-adduktban a középtávú elektronkorreláció, amely pontosabb leírásához szükséges lenne, a HF kicserélődési tag arányának csökkentése a számítások során. Ezt a B3LYP* funkcionállal végzett számítások is megerősítették, hiszen a B3LYP-hez képes jóval alacsonyabb, a kísérleti értékek nagyságrendjébe eső NO-kötési energiát adott.

5. táblázat: A vizsgált modellvegyületek és NO komplexeiknek a relatív energiája kcal/mol-ban.^a

Báziskészlet kombináció (Fe/amidin ligandum)											
		cc-pVTZ/cc-pVDZ			cc-pVQZ/cc-pVDZ			cc-pVTZ/cc-pVTZ			cc-pV ∞ Z/ cc-pVTZ
	Rendszer	HF	CCSD	CCSD(T)	HF	CCSD	CCSD(T)	HF	CCSD	CCSD(T)	CCSD(T)
model 1	² [Fe]	102,7	52,5	37,8	102,8	48,5	33,2	103,3	53,9	38,5	29,8
	⁴ [Fe]	61,7	28,3	18,8	61,7	25,7	16,0	62,4	30,0	20,4	13,9
	⁶ [Fe]	0	0b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	¹ [Fe-NO] ^d	224,5	55,0	1,9 (7,5)	224,2	49,4	-4,7 (0,4)	223,7	55,7	1,4 (c)	-9,3(-4,5)
model 2	² [Fe]	101,9	22,9	0,6	101,7	18,6	-4,1	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-7,4
	⁴ [Fe]	55,2	17,3	7,4	55,1	14,6	4,3	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	2,2
	⁶ [Fe]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	0,0
	¹ [Fe-NO] ^d	222,0	44,7	-10,7	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>bb</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
model 3	¹ [Fe]	96,4	46,4	37,2	95,7	42,6	32,9	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	30,4
	³ [Fe]	65,0	28,7	21,8	64,5	26,2	19,0	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	17,3
	⁵ [Fe]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	0,0
	² [Fe-NO] ^d	178,3	36,7	-3,6 (1,6)	178,7	32,7	-8,7(-4,0)	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	-12,7(-8,3)

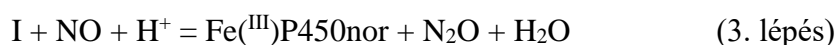
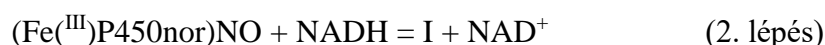
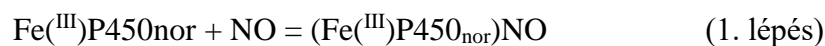
^aAz eredményeket számos báziskészlet kombinációval meghatároztuk, valamint megadjuk a CCSD(T) számítások esetén végtelen bázisra extrapolált értéket is. A NO-komplexeik BSSE korrigált CCSD(T) energiája zárójelben látható. *b* nem tudtuk elvégezni a számítást a rendszer mérete miatt. *c* Ezeket a számításokat nem végeztük el. *d* A komplex relatív energiáját a szeparált nagyspinű vas komplexhez és NO ligandumhoz képest számítottuk ki.

4.2. A P450_{nor} enzim által katalizált reakció mechanizmusa [D7]

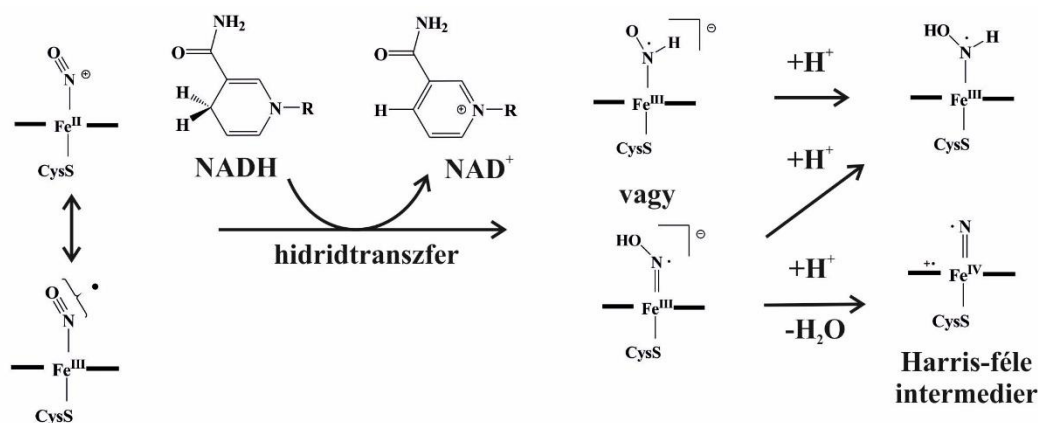
A 3. fejezetben tárgyalt citokróm P450 enzimek egyik szubsztrátja az oxigén, amely megkötődése után két elektrontranszfer lépés során redukálódik (3. ábra). Az elektronok a NADPH-ról a membránhoz kötött citokróm P450 reduktáz enzim segítségével kerülnek át a CYP enzimre, s azon belül az oxigénre.¹⁹⁴ Ritkák, de léteznek önmagukban is működőképessé CYP enzimek, amelyek közvetlenül képesek a NADH/NADPH-t megkötni, s nincs szükségük más redoxpartnerre. Ezek közé az enzimek közé tartozik a nitrogén-monoxid reduktáz enzim (P450_{nor}), amelynek szubsztrátja a NO és nem az O₂.

A P450_{nor} a denitrifikáló *Fusarium oxysporum* gombában található, amely anaerob körülmények között, nitrátlégzés során a környezetében található nitrátionokat több lépésben és több enzim segítségével dinitrogén-monoxiddá alakítja, melynek üvegházhatása 300-szorosa a szén-dioxidénak.¹⁹⁵ Ezért a nitrátban gazdag műtrágyázott területeken számottevő, erősen üvegházhatású dinitrogén-monoxid keletkezésére lehet számítani.¹⁹⁶ Az enzim vizsgálatának élettani vonatkozásai is vannak, ugyanis a hisztoplazmózist (gombás tüdőgyulladást) okozó *Histoplasma capsulatum* egy P450_{nor}-ral homológ enzimmal (61% szekvenciaazonosság, 79% hasonlóság) tudja kivédeni az immunrendszer támadását, miközben a nitrogén-monoxidot dinitrogén-monoxiddá redukálja.¹⁹⁷

A P450_{nor} saját NADH kötőhellyel rendelkezik. Az általa katalizált folyamat röviden három fő lépésből áll:

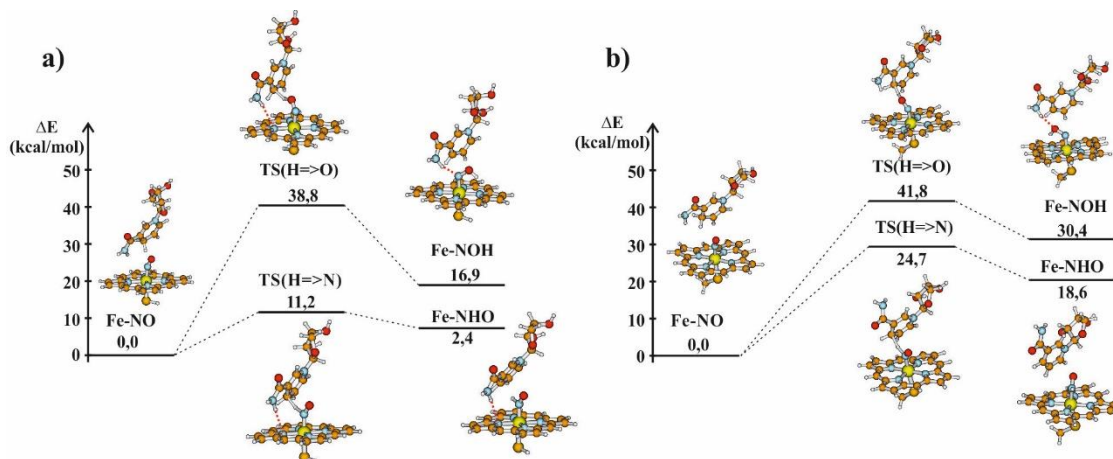


Az I-vel jelölt intermedier a legelfogadottabb nézet szerint hidridtranszfer során alakul ki, a NADH pro-R helyzetű hidrogénjét adja át hidridként. Érdekes kérdés, hogy a hidridtranszfer a nitrogén- vagy oxigénatomra irányul-e, mert az utóbbi esetben Harrisszerint¹⁹⁸ lehetőség van egy – a Cpd I-gyel analóg – N-ferrilkomplex kialakulására (27. ábra), amely – ha valóban létrejön – a monooxigenációs reakciókkal analóg nitrogénbeépülési reakciók (például amincsoport kialakítása) előtt nyithatja meg az utat.



27. ábra Közvetlen hidridtranszfer és a Harris-féle (N-ferril) intermedier kialakulásának lehetséges útvonala a P450_{nor}-ban

A nitrogén-monoxid oxigén- és nitrogénatomjára irányuló hidridtranszfer aktiválási energiáját vizsgáltuk, hogy kiderítsük vajon létrejöh-e az N-ferrilkomplex. A gázfázisú és a QM/MM számítások egyértelműen azt mutatták, hogy a nitrogénre irányuló hidridtranszfer a kedvezményezett. A számított energiaprofilokat az 28. ábra mutatja. Számottevő eltérést a kétféle eljárás során a H→N típusú hidridtranszfer gátjában találtunk, ami a kombinált QM/MM módszer esetében 13,5 kcal/mol-lal nagyobbak adódott, de még így sem eredményezte azt, hogy a H→O típusú folyamat váljék kedvezőbbé. Figyelembe véve a magas energiagátakat, az oxigénatomra irányuló hidridtranszferre nem kell számítani, így a NADH kofaktor hidrogénje a nitrogén-monoxid nitrogénatomjára kerül. Ennek következményeként a Harris-féle N-ferril intermedier kialakulása a *Fusarium oxysporum* P450_{nor} enzimjében nem következhet be.



28. ábra A nitrogénre és az oxigénre irányuló hidridtranszfer a) gázfázisú (B3LYP-D3/6-31G*(LANL2DZ)/cc-pVTZ,) és b) QM/MM energiaprofiljai B3LYP-D3/6-31G*(LANL2DZ)/6-311+G*/CHARMM27 szinten.

4.3. Mioglobin és gázmolekulák reakciója [D8]

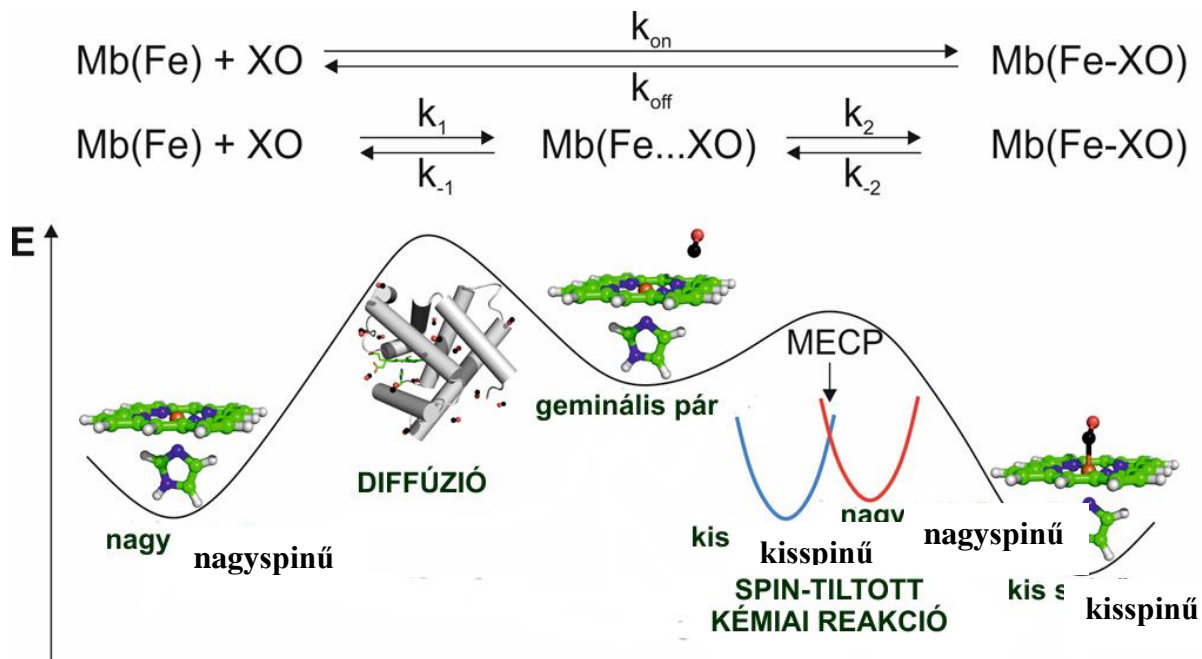
Az előző alfejezetben láttuk, hogy a *Fusarium oxysporum* gombában található P450_{nor} enzim egyik szubsztrátja a nitrogén-monoxid. Emberben a NO megkötésére egyedül az oldható guanilil cikláz (sGC, soluble guanylyl cyclase) képes hemcsoportján keresztül, amely az enzim aktivációjához és másodlagos hírvivő molekulák (cGMP) képződéséhez vezet.^{159,199–202} Ahhoz, hogy ezt a folyamatot vizsgálni tudjuk, első lépéseként szerettünk volna egy olyan módszert kidolgozni, amellyel megbízhatóan tanulmányozhatjuk a gázdifúziót fehérjékben, s modellezhetjük a hemcsoport és kétatomos gázmolekulák között lejátszódó reakciót. Azért esett a választásunk a mioglobinra, mert a NO és CO kötődés kinetikája kísérletileg alaposan tanulmányozott, és megbízható reakciósebességi koefficiens értékek találhatóak az irodalomban.¹⁸⁰ A lejátszódó reakció érdekessége, hogy formálisan spin-tiltott: a reakció kezdetén a hemcsoport nagyspinű, kvintett állapotban van, a termék viszont kisspinű.

A gázmolekula és fehérje reakciójának két fő lépése a gázmolekula diffúziója a környezetből az aktívhelyre, és a gázmolekula és a hemcsoport között lejátszódó kémiai reakció (29. ábra). A két folyamat eltérő természete más-más megközelítést igényel: a diffúziót molekuladinamikai szimulációkkal, a kémiai reakciókat pedig DFT alapú kvantumkémiai számításokkal modelleztük.

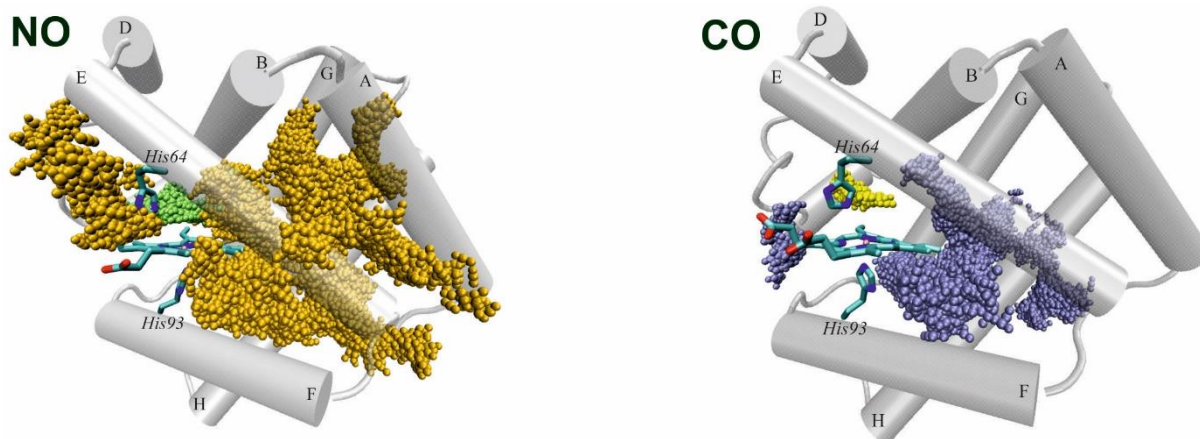
A mioglobinon a 2. fejezetben ismertetett módon periódikus határfeltételeket és dodekaédes dobozt alkalmazva molekuladinamikai (MD) számításokat végeztünk és ekvibrációt követően 40 gázmolekulát (NO-t vagy CO-t) helyeztünk el az oldószerfázisban, és 300 ns hosszú MD szimulációkat futtatunk. Ebben a rendszerben a gázok koncentrációja kb 0,29M volt, amely jelentősen magasabb a fiziológiai koncentrációnál. Ugyanakkor irodalmi adatok bizonyítják, hogy 0,5 M koncentrációig nem befolyásolja a számított diffúziós reakciósebességi együtthatókat a gázok koncentrációja, viszont jobb mintavételezést tesz lehetővé.²⁰³ Megvizsgáltuk, hogy a fehérjén belül hol találhatóak a gázmolekulák a szimuláció során. A 30. ábra tanúsága szerint a NO sokkal nagyobb valószínűséggel fordul elő a fehérjében, mint a CO.

Az analízis következő lépésében a trajektória minden egyes szerkezetében meghatároztuk az egyes gázmolekulák helyét, hogy azok az aktív zsebben, a fehérje egyéb részében vagy az oldószerben találhatóak-e. Utána megszámláltuk, hogy hány ki-be diffúziós esemény történt a 300 ns alatt (vagyis összesen hányszor ment egy meghatározott gázmolekula az oldószerből be az aktív zsebbe, majd tért vissza az oldószerbe), és ebből ki tudtuk számolni a gázok diffúziós

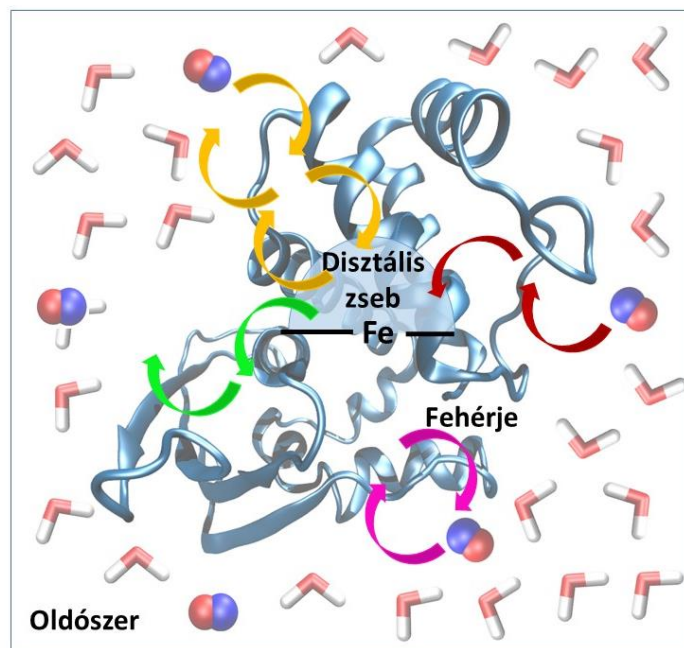
reakciósebességi állandóját (31. ábra). Modellünk összesen három állapotot vesz figyelembe (nagyspinű: szeparált enzim és gázmolekula, geminális pár: a gázmolekula az aktív zsebben található, de a kémiai kötés még nem alakult ki, kisspinű: létrejött a hexakoordinált vasat tartalmazó addukt), de hasonló elven működő, jóval bonyolultabb Markov modelleket használtak gáz diffúzió vizsgálatára mioglobinban,²⁰⁴ és nitrogénáz/hidrogénáz enzimekben is. 205–207



29. ábra Gázmolekulák és Mioglobin (Mb) között lejátszódó reakció felbontása két fő lépcsőre, és az egyes lépésekhez tartozó reakciósebességi együtthatók definíciója



30. ábra NO és CO diffúziója mioglobinban. Az aktív helyen lévő molekulákat zölddel illetve sárgával jelöltük.



31. ábra Diffúziós reakciósebességi együtthatók meghatározására használt kinetikus modell sematikus ábrázolása. A rendszert három részre osztottuk: oldószer fázis (vízmolekulák pálcikával ábrázolva, fehérje: szalagmodellel ábrázolva, és a geminális pár állapot (kicsivel kisebb, mint a disztális zseb.) A hemcsoportot vastag fekete vonalak jelképezik. A ligandummolekulák (van der Waals reprezentáció) többféle útvonalon be- és kidiffundálhatnak a disztális zsebbe/zsebből. A disztális zseb és fehérje, valamint a fehérje és az oldószerfázis közti oszcillációkat nem vettük figyelembe.

A diffúziós reakciósebességi koeficiensek a következő egyenletekkel határozhatóak meg:

$$\frac{d[XO]_{be}}{dt} = -k_1[E][XO] = \frac{N_{ki-be}}{N_A} \cdot \frac{1}{t \cdot V} \quad (8)$$

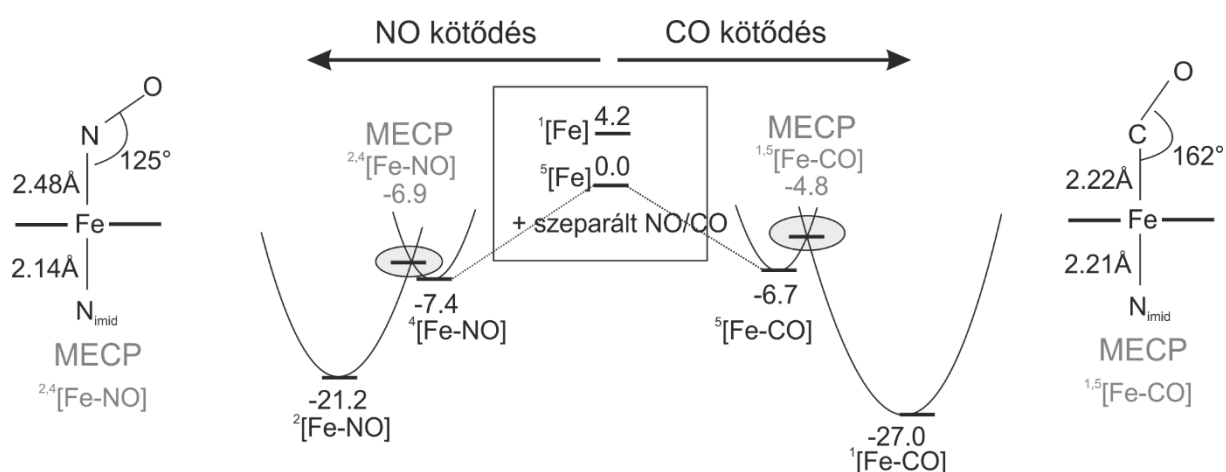
$$\frac{d[XO]_{ki}}{dt} = -k_{-1}[E \cdots XO] = \frac{N_{ki-be}}{N_A} \cdot \frac{1}{t_{XO,zseb} \cdot V} \quad (9)$$

ahol $[E]$ a fehérje, $[XO]$ a gázmolekula, $[E \cdots XO]$ pedig a geminális pár koncentrációja a szimulációban, V a rendszer térfogata, N_A az Avogadro-szám, N_{ki-be} a ki-be diffúziós események száma (egyensúlyban a ki és be események száma megegyezik), t a szimulációs idő, $t_{XO,zseb}$ pedig a ligandumok által a disztális zsebben töltött idő. Egy ki-be diffúziós eseménynek azt tekintettük, amikor az oldószerfázisból egy gázmolekula bediffundál az aktívhelyre, majd visszatér az oldószerfázisba.

Az MD szimulációkat többféle vízmodellel is elvégeztük, és nem tapasztaltunk nagyságrendbeli eltérést a diffúziós reakciósebességi együtthatók értékében, sem a sorrendjük nem változott meg a két vizsgált gázmolekula esetén. Ezen állandók értékei természetesen függték az alkalmazott vízmodellektől. A TIP4P vízmodellel számított értékek a 6. táblázatban láthatóak. A CO valamivel lassabban diffundál be az aktívzsebbe, mint a NO. Mind a CO-ra, mind a NO-ra számított reakciósebességi koefficiensek nagyon jó egyezést mutatnak a kísérleti értékekkel, és visszaadják azt a tendenciát is, hogy a k_{-1} értéke valamivel kevesebb, mint a fele a k_1 értékének.^{208,209}

A mioglobin nyugalmi helyzetében a központi Fe^{2+} ion ötös koordinációjú, és nagyspinű, vagyis kvintett állapotban van. Ugyanakkor kétatomos gázmolekulák megkötése során a vasion spinállapota megváltozik, a NO esetében a termék dublett, a CO esetén pedig szinglett állapotú.³⁰ Mindez azzal jár, hogy a reakció során NO esetében 1, CO esetén pedig két elektron spinje meg kell változzon. Az spin-tiltott folyamatok leírásához speciális eszközökre van szükségünk: meg kell határoznunk a nagyspinű és a kisspinű potenciális energia felületek minimális energiájú metszéspontját (MECP: minimum energy crossing point), és ezen a ponton keresztül valósulhat meg a reakció.^{28–30}

A 32. ábra mutatja a spin-tiltott reakciók legfontosabb állapotait és energiaviszonyait. A NO megkötődéséhez tartozó MECP energiája alig magasabb a geminális pár energiájánál, míg a CO esetén valamivel nagyobb az energiakülönbség. Mindkét reakció erősen exoterm.



32. ábra A NO és CO ligandumok hemcsoporthoz történő kötődésének legfontosabb állapotai és az azonosított MECP-k legfontosabb geometriai paraméterei. A különálló hisztidin-ligált hemcsoport alapállapota kvintett. A létrejövő geminális komplexek kvartett illetve kvintett állapotúak. Az $[\text{Fe}]$ jelölés a hisztidin-ligált hemcsoportot jelöli.

A 6. táblázatban összegyűjtöttük a kísérletileg mért és az általunk MD szimulációk, DFT számítások, nem-adiabatikus átmeneti-állapot elmélet és reakciókinetikai megfontolások alapján jósolt reakciósebességi állandókat. NO esetében a reakció sebességmeghatározó lépése a gáz diffúziója az aktív zsebbe, így k_{on} megegyezik a k_1 értékével. A jósolt k_{on} értékek nagyon jó egyezést mutatnak a mért értékekkel, s különösen jó az egyezés, ha belegondolunk, hogy már pár kcal/mol-os eltérés az aktiválási energiákban több nagyságrendnyi eltéréshez vezetne a reakciósebességi együtthatókat tekintve. Ez viszont fontos megfontolásokra vezet a számítások pontosságára. A CO esetében a jósolt k_{off} értékek is a mért értékekhez képest két nagyságrenden belül vannak, viszont a NO esetén nagyon nagy az eltérés a mért és számított a jósolt k_{off} érték között. Ennek oka, hogy a DFT funkcionálok igen nagy hibával (közel 10 kcal/mol) jósolják a Fe-NO kötéserősséget hemtartalmú rendszerekben (lásd a 4.1 alfejezetet) és ez az eltérés igen nagy hatással van a disszociációs reakció jósolt sebességi együtthatójára.

6. táblázat: NO és CO megkötésének jósolt és mért sebességi együtthatói mioglobinban.^{210,211} Az egyes reakciósebességi állandók jelentését a 29. ábra mutatja. A k_1 és k_{-1} értékeket TIP4P vízmodellel végzett MD szimulációkból számítottuk, a k_2 és k_{-2} értékek meghatározásához a kvantumkémiai számításokat a B3PW91/6-311+G* szinten végeztük diszperziókorrekció felhasználásával.

	NO	CO
k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) (jósolt/kísérleti)	$4,7 \cdot 10^8/1,7 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^7/5,1 \cdot 10^7$
k_{off} (s^{-1}) (jósolt/kísérleti)	$3,0 \cdot 10^6/1,2 \cdot 10^4$	0,9/0,019
k_1 ($M^{-1} s^{-1}$) (jósolt/kísérleti)	$4,7 \cdot 10^8/3,5 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^7/1,2 \cdot 10^7$
k_{-1} (s^{-1}) (jósolt/kísérleti)	$1,8 \cdot 10^8$ /nem ismert	$2 \cdot 10^8/0,53 \cdot 10^7$
k_2 ($M^{-1} s^{-1}$) (jósolt)	$1,2 \cdot 10^9$	$7,1 \cdot 10^7$
k_{-2} (s^{-1}) (jósolt)	$2,0 \cdot 10^7$	0,9

4.4. Ligandum diffúzió H-NOX fehérjékbe [D9]

Az előző alfejezetben bemutatam azt a modellt, amellyel meghatározhatjuk gázok diffúziós sebességi együtthatóját fehérjékben, s amely lehetővé teszi, hogy összehasonlítsuk különböző gázok különböző fehérjékbe történő diffúziójának tulajdonságait.

A gázmolekulák, pl. a NO jelentős terápiás potenciállal bírnak. Ennek jó példája a nitroglicerín, amely a szervezetben NO-t ad le és több mint száz éve használják angina pectoris kezelésére. Ugyanakkor ezt a terápiás potenciált egyelőre nem tudjuk kiaknázni ezen vegyületek gáz halmazállapota, nagy reaktivitása, rövid felezési ideje és magas toxicitása miatt.^{212,213} Noha NO prekursor vegyületek megoldást jelenthetnek erre a problémára, de egyelőre nem létezik olyan módszer amellyel célzottan a terápiás helyre lehetne őket szállítani.²¹² A megoldást speciális gáztranszport rendszerek létrehozása jelentheti a NO/CO/O₂ gázok esetén.

A H-NOX fehérjék a hemtartalmú szenzorfehérjék közé tartoznak, és a gázligandumok megkötődése számos biokémiai választ idézhet elő.²¹⁴ Próbálkoztak azzal, hogy szolid tumorokba (tömör és kezdetben jól körülhatárolt daganatok) oxigént szállítsanak, s így javítsák a sugárterápia hatékonyságát.^{215,216} Hatékony gázszállító rendszerek tervezéséhez meg kell értenünk azokat a faktorokat, amelyek a gázok megkötését és szállítását befolyásolják. Ide tartozik (1) gázmolekula kölcsönhatása a hemcentrummal, amelyet a vasion betöltött d pályái és a ligandum π^* pályái közti visszadonáló kölcsönhatás befolyásol.¹⁶² Általános megfigyelés, hogy Fe(II)-tartalmú hemfehérjék esetén a NO > CO > O₂ sorrendben csökken a disszociáció egyensúlyi állandója (K_D), amelyek egymáshoz viszonyított értékei nagyjából 1:~10³:~10⁶ nagyságrendűek.²¹⁷ Ezenkívül a gázok megkötődését befolyásolja a (2) disztális zseb polaritása, mérete és alakja (3) valamint a fehérje térszerkezete, és a fehérjében gázok számára szabadon átjárható hálózatok és a gáztároló zsebek.

Az utóbbi két faktort vettük górcső alá. Ehhez hosszú (300-500ns) MD szimulációkat végeztünk eltérő ligandum specificitással és flexibilitással rendelkező bakteriális H-NOX fehérjéken. A *Nostoc sp* (*Ns*)¹⁶⁷ és a *Kordia Algicida* (*Ka*)²¹⁸ egy fakultatív anaerob mikroba, amely H-NOX fehérjéjének legfontosabb liganduma a NO, míg a *Caldanaerobacter subterraneus* (*Cs*) egy obligát anaerob mikroba és a H-NOX fehérjéje O₂-szenzorként működik.²¹⁹ Megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a NO, CO és O₂ diffúziós tulajdonságait a három fehérjében, meghatároztuk a gázvándorlási útvonalakat, valamint a gáztárolózsebeket.

A gázok vándorlási útvonalai a fehérjemátrixban számos kísérleti technikával (pl. irányított mutagenézis, EPr, röntgen-diffrakció Xe mátrixban) vizsgálhatók.^{203,220-222} Ezeket az elméleti módszerek, pl. MD szimulációk kiegészíthetik.^{203,223-225} Először arra voltunk kíváncsiak, hogy a fehérjék mely részei milyen mértékben érzékenyek a gázok jelenlétére, s

ehhez meghatároztuk és átlagoltuk minden egyes oldallánc fluktuációját (RMSF^a) az MD szimuláció során. (33. ábra) Minél nagyobb az RMSF érték annál mozgékonyabb az adott régió.

Mindhárom fehérjében az α BC, α F β 1 és a β 3 β 4 hurok a legmozgékonyabb, elnevezésükben az a két másodlagos szerkezeti elem szerepel, amelyet összekötnek. Ugyanezekről az hurkokról vetették fel korábban, hogy katalitikus szempontból fontosak, valószínűleg befolyásolhatják a ligandumok fehérjemátrixba történő bevándorlását.^{225,226}

Az előző alfejezetben bemutatott modellünk segítségével meghatároztuk az egyes gázok diffúziós reakciósebességi együtthatóját (k_1 és k_{-1} a 29. ábra alapján). (7. táblázat) Egyértelmű trend figyelhető meg: k_1 értéke az $O_2 > NO > CO$ sorrendben csökken minden fehérjében, amelyet valószínűleg a ligandumok mérete és kisebb mértékben a polaritása is befolyásol. Ezzel szemben semmilyen trend nem figyelhető meg a k_{-1} értékekben. Ennek legvalószínűbb oka az, hogy k_{-1} értékét nagyon erősen befolyásolja a ligandumok által a disztális zsebben eltöltött idő, ami gázonként és fehérjénként is nagyon változó.

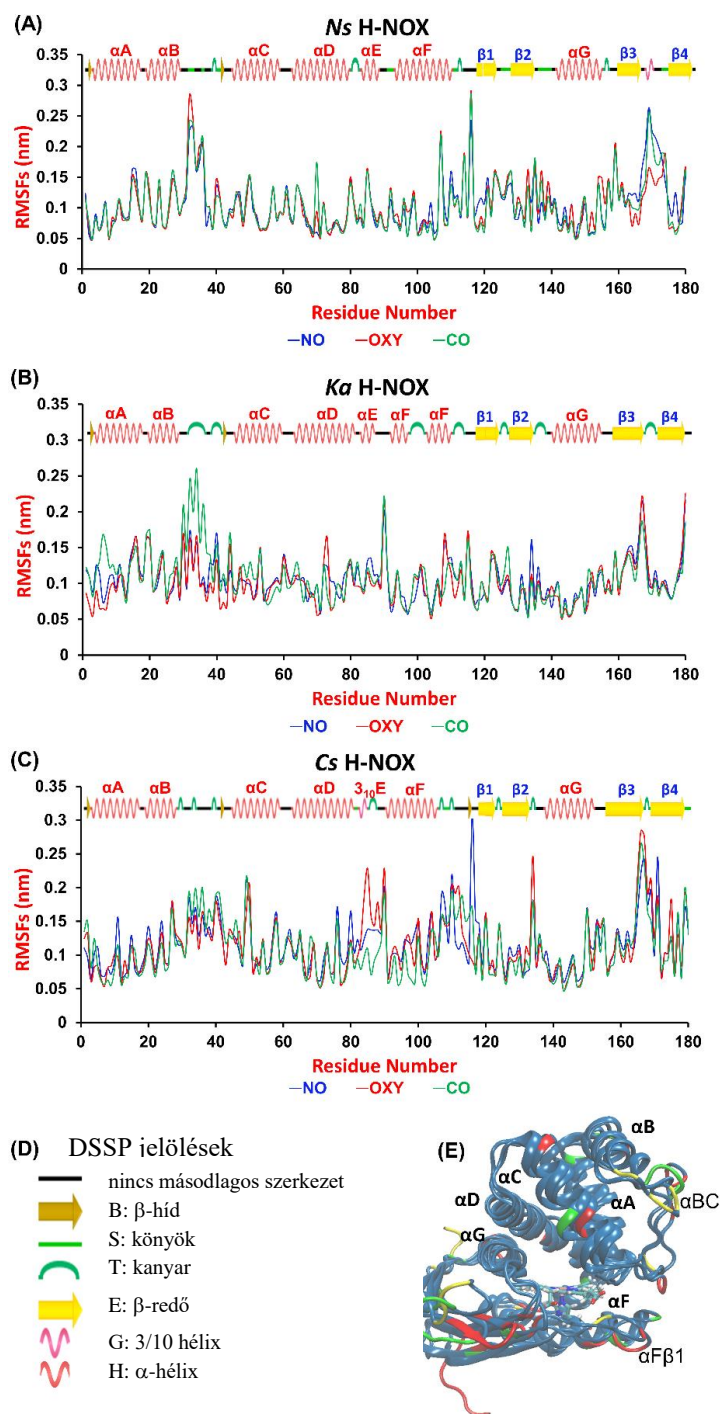
Ha egy adott gáz k_1 értékeit hasonlítjuk össze a három fehérje között, akkor megint egy egyértelmű trendet találunk $Ns > Ka > \text{mioglobin} > Cs$ sorrendben csökken (a mioglobinra vonatkozó adat a 4.3. fejezetben bemutatott munkából származik). Cs esetén nagyon kevés ki-be diffúziós eseményt figyeltünk meg, aminek következtében a statisztikai bizonytalansága ennek az értéknek jelentős. Ez arra is figyelmeztet, hogy óvatosan kezeljük a rá vonatkozó adatokat, de jelzi azt is, hogy valószínűleg ebben a fehérjében a leglassabb a diffúzió, összhangban azzal, hogy a NO megkötésének k_{on} értéke kisebb a Cs H-NOX fehérjében, mint a Ns H-NOX-ban.

H-NOX fehérjék esetén nagyon érdekes kérdés, hogy hogyan képesek a fehérjék szelektálni a különböző gázok között (különösen releváns ez a kérdés a humán sGC fehérje esetén, amely csak NO-t köt meg annak ellenére, hogy az oxigén sokszoros feleslegben van jelen a szervezetben). Ezért gázkeverékekkel is végeztünk MD szimulációkat, legjobb tudásunk szerint előttünk ilyet nem publikáltak az irodalomban. A k_1 értékeket nem befolyásolta jelentősen, hogy gázkeverékkel végeztük a szimulációkat, ugyanakkor a k_{-1} , és ebből következően a K egyensúlyi állandó értéke is jelentősen megváltozott annak köszönhetően, hogy a különböző gázok versengtek a disztális helyért.

^a RMSF: átlagos négyzetes fluktuáció négyzetgyöke:

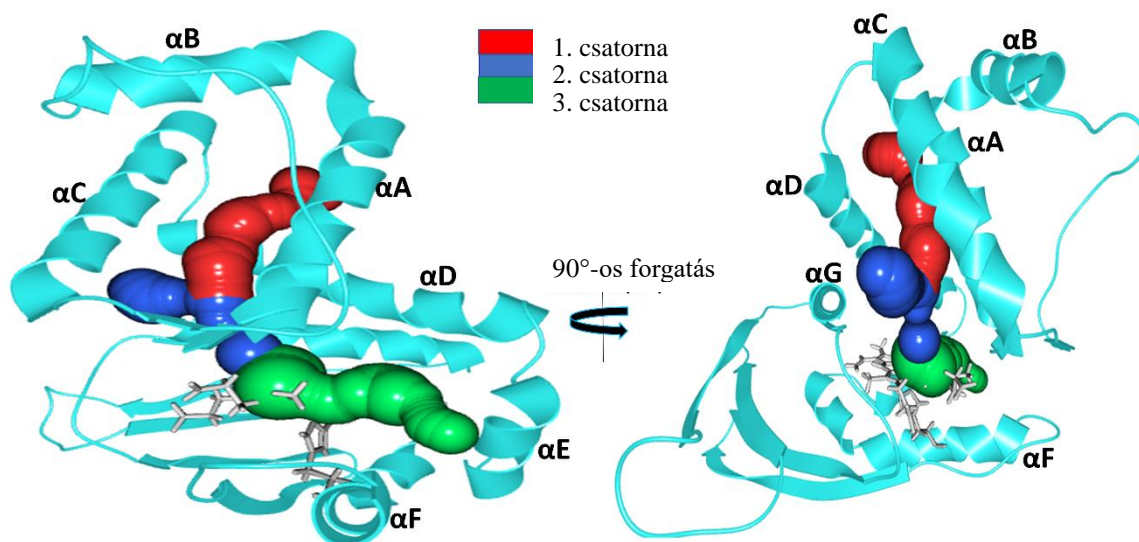
$$RMSF = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [r_i(t_j) - r_i^{ref}]^2}{N}}$$

ahol N az atomok számát jelöli, $r_i(t)$ az i -dik atom pozícióját a t -edik időpillanatban, r_i^{ref} az i -dik atom átlagos pozícióját a trajektória során.



33. ábra (A-C) Gázmolekulák jelenlétében végzett MD szimulációkból számított RMSF értékek a Ns, Ka és Cs H-NOX fehérjékben aminosavakra lebontva. A Cs H-NOX esetén a hosszú farokra (181-188-as aminosavak, amelyek a másik két rendszerben nincsenek jelen) számított értékeket nem mutatjuk a könnyebb összehasonlíthatóság kedvéért. (D) Másodlagos szerkezeti elemeket jelölő motívumok magyarázata (E) A három H-NOX fehérje egymásra illesztett szerkezete (zöld (Ns), sárga (Ka), piros (Cs)), ahol a mozgékonyabb régiókat nagyobb betűméret jelöli.

A 34. ábra mutatja a H-NOX fehérjékben azonosított „gázz szállító” csatornák hálózatát, amely nagyon hasonló a három fehérjében. Ezeket alapvetően a fehérjék harmadlagos szerkezete határozza meg, de az aminosav oldalláncok és a köztük kialakuló kölcsönhatások elzárhatják őket. Az 1. csatorna hosszú és apoláris oldalláncok határolják. A 2. és 3. csatorna sokkal rövidebb, s vegyesen poláros és apoláros oldalláncokkal. Az 1. és a 2. csatorna egy Y alakú rendszert alkot, amelynek közös szakasza vezet a disztális zsebhez.



34. ábra A H-NOX fehérjékben azonosított gáz vándorlási útvonalak. (Mivel a három fehérje harmadlagos szerkezete nagyon hasonló, a *Ns* H-NOX fehérjéjét mutatja az ábra. A hosszú apoláris csatornát piros, a rövidebb 2. és 3. csatornákat kék és zöld szín jelzi. A hemcsoport és a proximális hisztidin szürke színű.

A *Ns* H-NOX fehérjében a ligandumok alapvetően az 1. és 2. csatornán keresztül vándorolnak, mivel a 3. csatornában történő gázdifúziót a nagy térkitöltésű TRP74-es aminosav akadályozza. *Ka* H-NOX 2. csatornáján történő diffúzió két oldalról is gátolt: az oldószer felől egy kation- π kölcsönhatás, míg a disztális zseb felől két metioninoldallánc sztérikus kölcsönhatása blokkolja. A *Cs* H-NOX-ban pedig a ligandumok a 2. és 3. csatornát használják. Mindkettő lehetőséget ad a ligandumok számára, hogy eljuthassanak a proximális zsebbe is: így szerepet játszhatnak az sGC²⁰⁰, *Shewanella oneidensis* (*So*) H-NOX²¹⁴ és a *Vibrio cholera* (*Vc*) H-NOX reaktivitásában, amelyek esetén felmerült, hogy a ligandumot a hemcsoport proximális oldalán is meg tudják kötni.

7. táblázat: Kétatomos gázmolekulák számított és mért diffúziós reakciósebességi együtthatói, szimulációs idő, ki-be diffúziós események száma, valamint a ligandum által a geminális pár állapotban eltöltött idő a vizsgált H-NOX fehérjékben és mioglobinban.

Ligandum	N_{ki-be}^S	Szimulációs idő [ns]	geminális pár állapot [ns]	k_1 [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{-1} [s ⁻¹]	$K(k_1/k_{-1})$ [M ⁻¹]	Exp. k_{on} [M ⁻¹ s ⁻¹]	Exp. k_{off} [s ⁻¹]
<i>N_s H-NOX</i>								
O ₂	83	300	91	1.6×10 ⁹	9.1×10 ⁸	1.8	N/A	N/A
NO	34	300	55.8	6.5×10 ⁸	6.0×10 ⁸	1.1	3×10 ^{8,214}	5×10 ⁻²
CO	14	300	16.4	2.7×10 ⁸	8.5×10 ⁸	0.3	3×10 ^{6,214}	3.6
NO/O₂ keverék								
O ₂	23	200	15.17	1.3×10 ⁹	1.5×10 ⁹	0.86		
NO	9	200	12.10	5.1×10 ⁸	7.5×10 ⁸	0.68		
<i>K_a H-NOX</i>								
O ₂	57	300	21.3	1.1×10 ⁹	2.7×10 ⁹	0.4	N/A	N/A
NO	33	300	60.2	6.4×10 ⁸	5.5×10 ⁸	1.2	N/A	N/A
CO	7	300	0.27	1.4×10 ⁸	2.6×10 ¹⁰	0.0052	N/A	N/A
NO/O₂ keverék								
O ₂	37	200	19	2.1×10 ⁹	2.0×10 ⁹	1.1	N/A	N/A
NO	10	200	7.8	2.6×10 ⁸	1.3×10 ⁹	0.2	N/A	N/A
<i>C_s H-NOX</i>								
O ₂	7	200	63.7	2.6×10 ⁸	1.1×10 ⁸	2.4	4.3×10 ⁷	1.9
NO	1	200	1.42	3.8×10 ⁷	7.1×10 ⁸	0.053	1.5×10 ⁸	3.4×10 ³
CO	-	-	-	-	-	-	3.3×10 ⁶	0.5
<i>Mioglobinban számított[D8] és mért értékek²²³</i>								
O ₂ ²⁰⁸	N/A	N/A		N/A	N/A		1.7×10 ⁷	15
NO ²¹⁰	15	300		1.8×10 ⁸	8×10 ⁷		1.7×10 ⁷	1.2×10 ⁴
CO ²⁰⁸	21	635		1.1×10 ⁸	2.5×10 ⁸		5.1×10 ⁵	1.9×10 ⁻²

Az eredményeink nem támasztják alá azt a korábbi feltételezést, hogy a ligandumok minden H-NOX fehérjében a hemcsoporthoz kapcsolódó propionát-oldalláncoknál található kapun keresztül jutnának be az aktív helyre. Egyértelműen azt tapasztaltuk, hogy nem a csatorna hossza, sokkal inkább annak tágassága és potenciálisan a csatornában található tároló-irányító zsebek befolyásolják a gázok vándorlását. A tágas zsebek lehetővé teszik a ligandumok számára, hogy egymás mellett elhaladjanak, hasonlóan egy egyvágányos sínpályához, ahol bizonyos helyeken tudnak a vonatok egymás mellett elhaladni.

A fehérjékben található zsebek és üregek^a fontos szerepet játszanak a ligandumok megkötésében. Hemfehérjék esetében a disztális zseb a legfontosabb, de a fehérjében található egyéb zsebek is szerepet játszhatnak a ligandumok tárolásában. Ezért először globális deskriptorok segítségével jellemeztük a gázmolekulák és a fehérjemátrix kölcsönhatását (8. táblázat), majd megvizsgáltuk az egyes zsebek tulajdonságait is (9. táblázat). A zsebeket a 35. ábra mutatja.

8. táblázat: Gázmolekula-fehérje kölcsönhatások jellemzésére használt globális deskriptorok

rendszer	NO	O ₂	CO
Átlagosan a fehérjében található gázmolekulák száma			
<i>Cs</i>	9.4	9.5	7.0
<i>Ka</i>	16.4	9.8	7.6
<i>Ns</i>	17.6	11.4	8.2
Gázmolekulák fehérje mátrixszal kialakított átlagos összesített kontaktusai			
<i>Cs</i>	70,2	103,0	44,0
<i>Ka</i>	104,0	95,6	45,0
<i>Ns</i>	117,2	99,1	47,9
Gázmolekulára vetített átlagos fehérje kontaktusok száma			
<i>Cs</i>	7,5	10,8	6,3
<i>Ka</i>	6,3	9,7	6,0
<i>Ns</i>	6,7	8,7	5,8

A fehérje mátrixban található gázmolekulák száma a NO>O₂>CO sorrendben csökken (8. táblázat), kivéve a *Cs* H-NOX fehérjét, amely gyenge preferenciát mutat az O₂ tárolására,

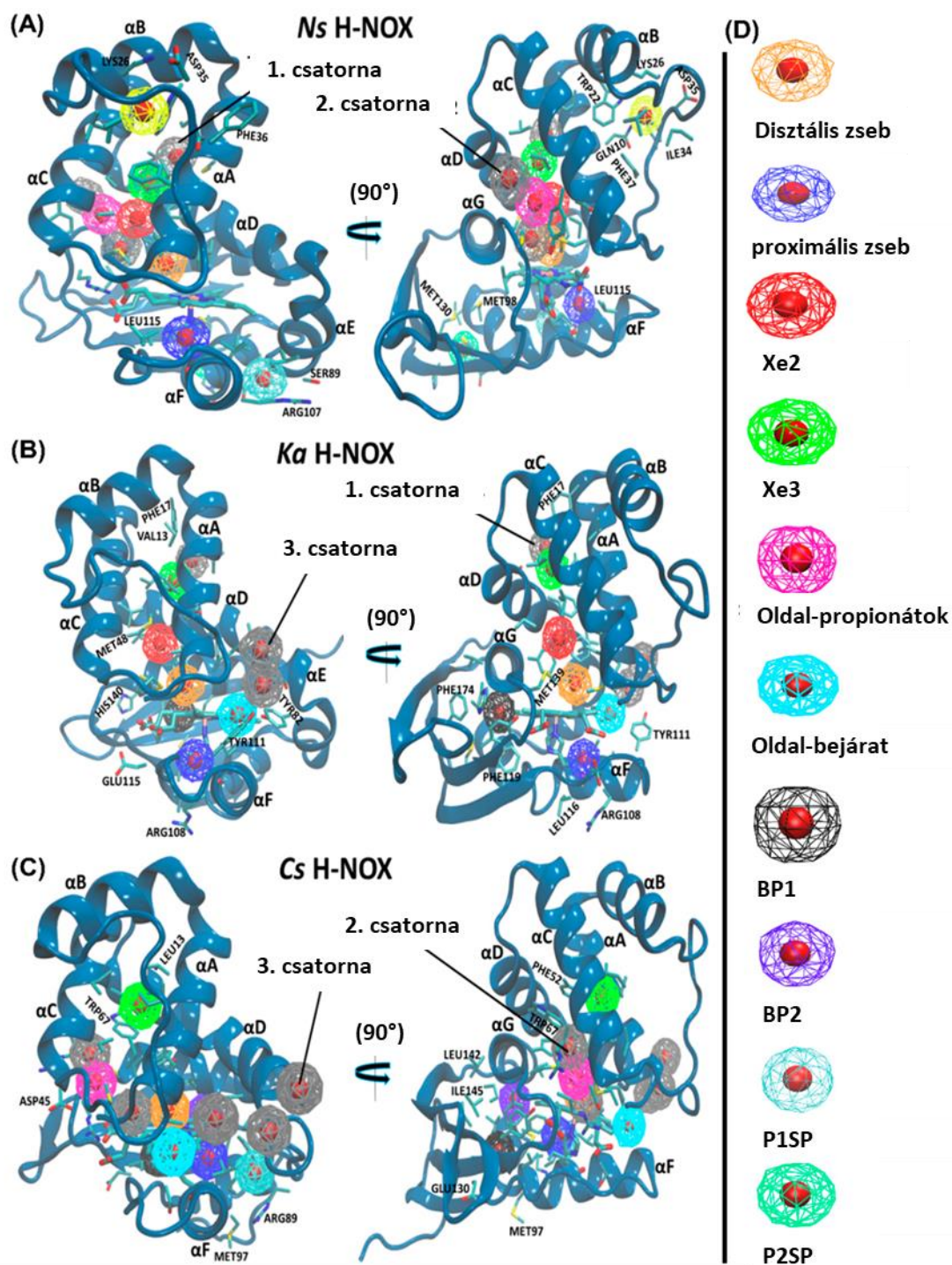
^a Az üregek a fehérje belsejében, míg a zsebek a felszínén találhatóak. Ugyanakkor a szakirodalom nem használja konzekvensen ezeket a szavakat, pl. a disztális zseb is a fehérje belsejében helyezkedik el. Ezért a dolgozatban innentől kezdve az üreget és a zsebet is zsebnek fogom hívni külön kiemelve azt, hogy a fehérje belsejében vagy felszínén található.

összhangban annak oxigén-szenzor funkciójával. A *Ns* és *Ka* H-NOX fehérjék NO-szenzorként működnek. Hasonló következtetést vonhatunk le az összes gázmolekulára számított fehérje kontaktusok számából is, amely azt mutatja meg, hogy átlagosan a gázmolekulák összesen hány fehérjeatommal vannak kapcsolatban. Az egy gázmolekulára számított átlagos fehérjeatommal való kontaktusok száma a zsebek tágasságáról szolgáltat információt, s legmagasabb a *Cs* H-NOX esetében: arra utal, hogy a gáztároló zsebek/vándorlási útvonalak ebben a fehérjében a legszűkösebbek. Ez eredhet abból, hogy ebben a fehérjében található a legtöbb sóhid, amely miatt a fehérje valamivel kompaktabb szerkezetű, mint a másik két fehérje.

A fehérjemátrixban és a felszínen található zsebeket a 35. ábra mutatja, néhány tulajdonságukat pedig a 9. táblázat foglalja össze. Összesen nyolc zsebet találtunk a *Ns* H-NOX-ban, hatot a *Ka* H-NOX-ban és hetet a *Cs* H-NOX-ban. A számítások helyesen azonosították a Xe1 xenonkötő zsebet a *Cs* H-NOX-ban,^{222,227} és a Xe2 és Xe3 zsebeket a *Ns* H-NOX-ban,²²⁸ amelyeket Xe jelenlétében végzett röntgen-diffrakciós mérések során találtak meg. A legtöbb zseb a csatornák mentén helyezkedik el. Amíg a *Ns* és a *Ka* H-NOX fehérjében számos tágas zseb található, amely egyszerre több gázmolekulát is be tud fogadni, addig a *Cs* H-NOX-ban található zsebek jellemzően egy molekula befogadására képesek. Mindez összecseng a korábbiakból levont következtetéseinkkel. A NO gázmolekulák számát a fehérje mátrixban kétféle módon is meghatároztuk és a *Ns* és *Ka* H-NOX fehérjék esetén meglehetősen nagy különbséget találtunk: (*Ns*: ~10 vs 17,6 és *Ka*: ~9 vs 16,4). Ennek oka véleményünk szerint, hogy a gázmolekulák ideiglenesen nemcsak csatornában és zsebekben fordulnak elő, hanem a fehérje többi részében is előfordulhatnak kis valószínűséggel, de ezeken a helyeken nem töltenek elég időt ahhoz, hogy zsebként azonosítsuk őket. A *Cs* H-NOX esetén a két érték sokkal jobb egyezést mutat (7,2 vs 9,4) egyetértésben a fehérje feltételezett kompaktabb szerkezetével.

Meghatároztuk, hogy az egyes ligandumok átlagosan mennyi időt töltenek el a különböző zsebekben. Egyértelmű fordított összefüggés létezik a ki-be lépések száma és a tartózkodási idő között. Az átlagos tartózkodási idő 20-200 ps volt, bár ennél hosszabb tartózkodási időt is megfigyeltünk: pl. 2-8 ns volt a NO és a CO tartózkodási ideje a *Ka* H-NOX proximális zsebében. Eredetileg arra számítottunk, hogy a fehérje felszínén lévő zsebekben a ligandumok rövid időt töltenek el, míg a jobban eltemetett zsebekben hosszabb időt. Ezt a várakozásunkat a számítások nem mindenben támasztották alá. Úgy tűnik, hogy azokban a zsebekben a leghosszabb a ligandumok tartózkodási ideje, amelyeket töltött és nagy hidrofób oldalláncok is határolnak (pl. a *Ns* H-NOX disztális felületi zsebe).

Az alfejezet elején feltettük a kérdést, hogy milyen iránymutatás adható gáztranszport-rendszerek tervezésére. Végezzünk el egy gondolat kísérletet, melynek segítségével megbecsülhetjük, hogy milyen hosszú időt kellene a ligandumoknak a fehérjésekben eltölteniük. A hemoglobin 1-ben az O_2 felszabadulásának k_{off} értéke $61,1 \text{ s}^{-1}$.²²⁹ Ha eltekintünk a kémiai kötés felszakadásától, milyen hosszú tartózkodási időre lenne szüksége, ahhoz, hogy ekkora k_{off} értéket el tudjunk érni? Behelyettesítve a (8) egyenletbe az Avogadro-számot, a fehérjekoncentrációt ($0,044 \text{ M}$) és a cellatér fogatot ($3,78 \times 10^{-22} \text{ dm}^3$), és ha a ki-be események számát 1-nek tekintjük, akkor $1,64 \text{ ms}$ hosszúságú tartózkodás időt kapunk, ami három nagyságrenddel nagyobb, mint amit bármelyik zsebben megfigyeltünk. Ráadásul a szimulációinkban mind a gázkoncentráció, mind a fehérje koncentráció jóval magasabb volt a valóságosnál, ami a tartózkodási idő jelentős alulbecslését okozza. Mindemiat a legjobb megoldásnak az tűnik, ha több hemcsoportot építünk be a fehérjébe,²³⁰ mert nagyon leegyszerűsítve a képet a hemcsoport és az oxigén között kialakuló kémiai kötés (és ennek felhasadásához szükséges aktiválási energia) teszi lehetővé, hogy a szervezetben a hemoglobin nagyobb távolságokra tudja elszállítani az oxigént.



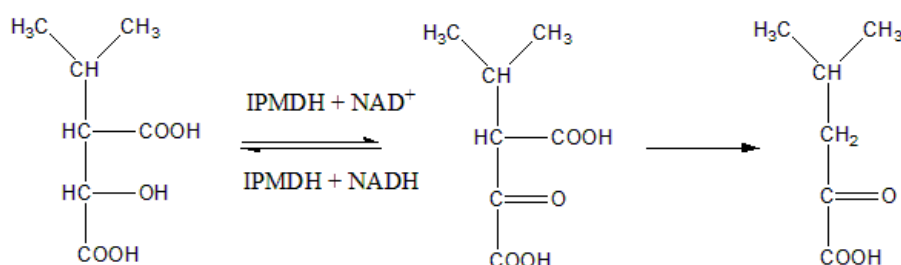
35. ábra A vizsgált H-NOX rendszerek gázkötő zsebei. A zsebek azonosítására használt színek az ábra jobb oldalán láthatóak.

9. táblázat Ns/Ka/Cs H-NOX rendszerekben azonosított zsebek fontosabb tulajdonságai. A zseb betöltöttsége a szimulációs idő százalékában van megadva. NO-tartalmú rendszerek esetén a zsebben átlagos található és maximálisan megfigyelt gázmolekulák száma. Disztális zseb esetén további karakterisztikus tulajdonságok szerepelnek.

Zseb	NO	O ₂	CO
Ns H-NOX			
➤ Disztális zseb:	99.3%/1.32/4	92.8%	91.13%
- a gázmolekulák vastól mért átlagos távolsága	4.0 Å	3.95 Å	4.3 Å
- átlagosan a zsebben töltött idő	920.2ps	189.8ps	609.0ps
- ki-be események száma	323	1469	463
➤ Proximális zseb :	47.90%/1.09/2	28.6%	0.0%
1. csatorna (Xe2 & Xe3):			
*Xe2:	89.6%/1.08/4	50.7%	65.2%
*Xe3:	92.4%/1.21/4	57.5%	56.1%
2. csatorna (oldal-propionátok)			
	96.0%/1.51/4	40.4%	24.0%
3. csatorna (oldal-bejárat):			
	27.8%/1.08/3	18.0%	16.6%
➤ Felszíni zsebek (SP):			
*Disztális felszíni zseb (DSP) :	75.8%/1.00/1	38.3%	34.2%
*Proximális felszíni zseb 1 (P1SP) (α F, α E):	66.8%/1.02/2	55.7%	45.4%
*Proximális felszíni zseb 2 (P2SP) (α F, β -redő):	99.25%/1.00/2	9.0%	12.8%
Ka H-NOX			
➤ Disztális zseb:	86.1%/1.32/4	42.2%	13.5%
- a gázmolekulák vastól mért átlagos távolsága	5.3 Å	5.1 Å	5.6 Å
- átlagosan a zsebben töltött idő	116.0ps	59.0ps	45.0ps
- ki-be események száma	2258	2255	922
➤ Proximális zseb:	99.95%/1.00/2	75.1%	99.44%
1. csatorna 1 (Xe2 & Xe3):			
*XE2:	87.64%/1.10/4	26.4%	55.65%
*XE3:	95.6 %/1.11/3	37.9%	76.3%
2. csatorna 2 (oldal propionátok):			
	29.2%/1.04/3	10.7%	16.67%
3. csatorna 3 (oldal-bejárat):			
	86.6%/1.20/4	18.2%	22.0%
➤ Belső zsebek/üreg (BP1):	94.8%/1.21/3	21.3%	13.4%
Cs H-NOX			
➤ Disztális zseb:	64.8%/1.2/2	44.4%	0.0%
- a gázmolekulák vastól mért átlagos távolsága	4.3 Å	3.6 Å	-
- átlagosan a zsebben töltött idő	27.5ps	86.6ps	-
➤ Proximális zseb:	3.3%/1.00/1	56.9%	0.4 %
➤ A csatornákon át elérhető üregek:	82.7%/1.00/2	22.2%	75.1%
2. csatorna (oldal-propionátok):			
➤ Proximális felszíni zseb 1 (P1SP) (αF, αE):	10.2%/1.01/2	12.8%	84.4%
➤ Belső zsebek/üregek (BP):			
BP1:	0.2%/1.00/1	69.5%	0.0%
BP2:	5.8%/1.00/2	28.5%	99.3%
BP3:	39.5%/1.00/1	4.0%	0.0%

5. Izopropil-malát dehidrogenáz (IPMDH) enzim

Az oxidatív dekarboxiláció a legjelentősebb biológiailag is releváns oxidációs átalakulások közé tartozik, hiszen kulcsszerepet játszik a citromsav (vagy Szent-Györgyi-Krebs) ciklusban, amely az aerob anyagcsere-folyamatok kikerülhetetlen lépcsőfoka, valamint részt vesz számos aminosav bioszintézisében is. Az izopropil-malát dehidrogenáz enzim (IPMDH) a β -hidroxisav oxidatív dekarboxilázok családjába tartozik, amely egy NAD^+ kofaktort felhasználva képes a szubsztrát β -helyzetű hidroxilcsoportját ketocsoporttá oxidálni (36. ábra).²³¹ Ugyanebbe a családba tartozik az izocitrát-, homoizocitrát-, valamint a tartarát-dehidrogenáz enzim is. Noha ezen enzimek szubsztrátjai különbözőek, a reakciók mechanizmusa feltehetően hasonló.

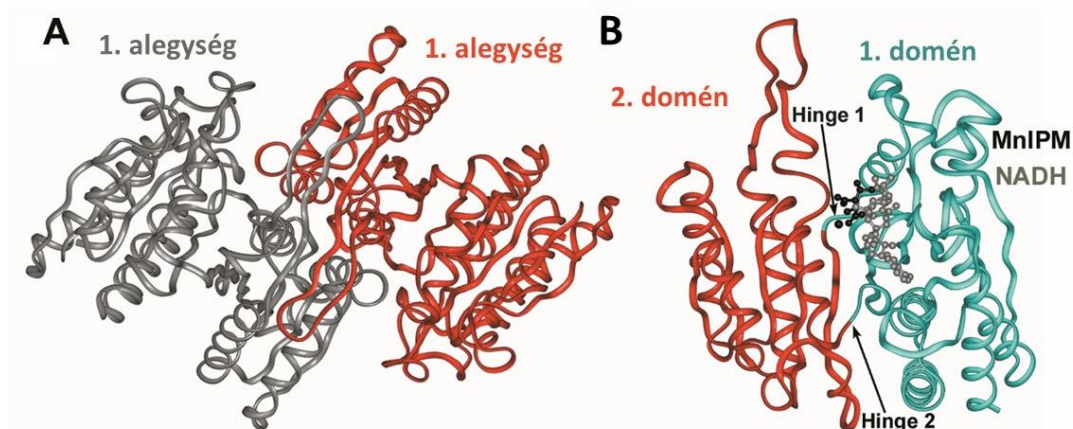


36. ábra Az IPMDH enzim által katalizált reakció sémája. A reakció két fő lépésre bontható: az oxidációs lépést követi a dekarboxiláció.

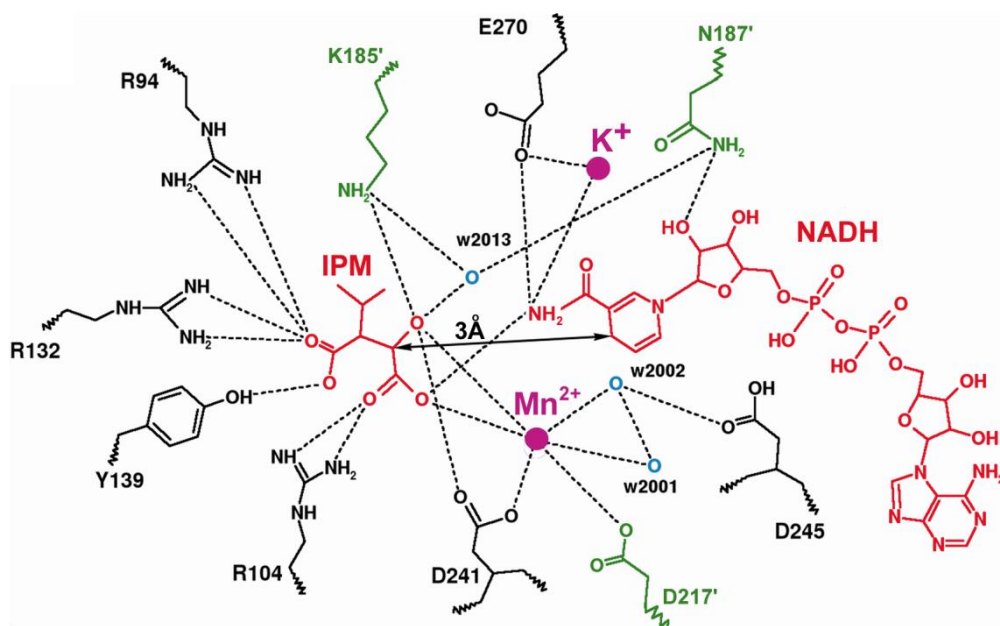
Az IPMDH enzim gyógyszeripari jelentőségét az adja, hogy a baktériumok, gombák és növények leucin metabolizmusának esszenciális enzime,²³² amely nincs jelen emlősökben, s ezért potenciális antibakteriális gyógyszer-célpont. Prof. Vas Mária kutatócsoportja (TTK) sikeresen kristályosította a *Thermus thermophilus* (*Tt*) baktérium enzimjét egy szubsztrátanalóggal, NADH -val együtt (37. ábra) [D10]. Az enzim két alegységből áll, amelyeket két-két domén épít fel. A kristályszerkezet alapján az izopropil-malát szubsztrát és a NADH kofaktor a két domén közti mozgékony régióban (hinge) kötődik meg. A 38. ábra mutatja az enzim aktív helyét kétdimenzióban és jelzi a legfontosabb kölcsönhatásokat.

Az enzim fontossága ellenére viszonylag kevés tanulmány foglalkozott a reakció mechanizmusával, noha lényeges különbségek is felmerülnek az enzimcsalád más tagjaihoz képest^{231,233}, például, hogy mi lehet a káliumion szerepe a katalízisben. Ezért Prof. Vas Mária csoportjával kísérleteket és számításokat is ötvöző kutatásunkban arra kerestük a választ, hogy mi a fémionok szerepe és vajon mely aminosavak esszenciálisak a katalízisben. Ehhez irányított mutagenézissel számos mutánst állítottunk elő, és meghatároztuk az enzimkinetikai

paramétereiket (K_M , és v_{max}), a reakció mechanizmusának értelmezéséhez pedig QM/MM számításokat végeztünk.



37. ábra AZ IPMDH szerkezete (pdb kód: 4F7I) (A) a funkcionális enzim dimer két alegységből épül fel (B) Az alegységek két doménből épülnek fel, az IPM ligandum, a NADH szubsztrátanalóg, és a Mn^{2+} kofaktor a két domén közti mozgékony régióban (Hinge 1 és Hinge2) kötődik meg. MnIPM a Mn^{2+} ionhoz kötött IPM ligandumot jelenti.

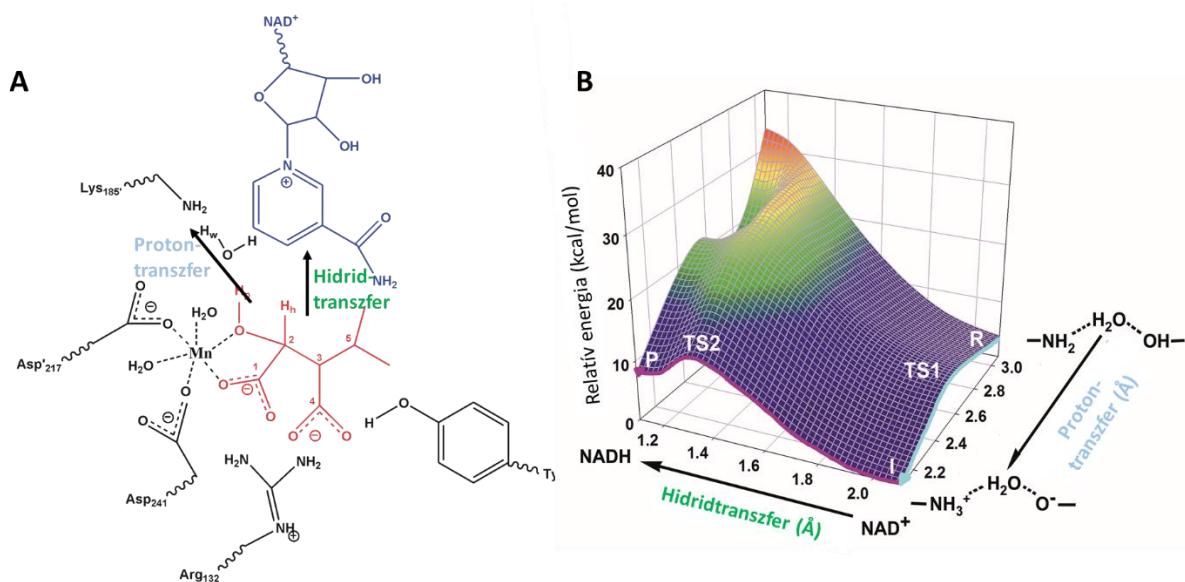


38. ábra AZ IPMDH aktív centrumának sematikus, kétdimenzióra vetített ábrázolása (pdb kód: 4F7I). A két különböző alegységből származó aminosav oldalláncok feketére és zöldre vannak színezve, és a vesszős nevek arra utalnak, hogy az adott aminosav a másik alegységből származik (pl. K185'). A kék „o” jel a röntgenszerkezetben talált vízmolekulát jelzi, az IPM szubsztrátot és a NADH-t pirossal jelöltük, a fémionokat pedig rózsaszín gömbbel. A fontosabb kölcsönhatásokat szaggatott vonalak jelzik.

5.1. Az IPMDH enzim által katalizált reakció mechanizmusa [D10]

Prof. Vas Mária kutatócsoportja (TTK) sikeresen kristályosította a *Thermus thermophilus* (*Tt*) baktérium IPMDH enzimjét a NADH szubsztrát-analóggal, s szeretnénk volna alátámasztani, hogy a kapott szerkezet jól utánozza a valós enzim-szubsztrát komplexet, és kompetens modellje a valós rendszernek. Ezért a számítások során NADH helyett mindig NAD⁺ kofaktor használtunk, s arra kerestük a választ, hogy (1) a kristályban megfigyelt szerkezet lehetővé teszi-e az oxidációs reakció lejátszódását, (2) ha igen, akkor mi a proton- és hidridiontranszfer reakciók sorrendje (3) mi a divalens Mn²⁺ vagy Mg²⁺ kation szerepe a reakcióban.

Ahhoz, hogy az IPMDH enzimben C₂-es szénatomhoz kapcsolódó hidroxilcsoport oxidálódjon két folyamatnak kell lejátszódnia: a hidroxilcsoportnak le kell adnia egy protont és a hidrid ionnak a NADH-ról a C₂-es szénatomra kell vándorolnia. Az aktív hely és a benne található savas/bázikus oldalláncok vizsgálatával megállapítottuk, hogy a legvalószínűbb protonakceptor a K185' lizin oldallánc aminocsoportja, amely, ahogy ezt a későbbiekben bizonyítottuk lásd az 5.3. fejezetet, valószínűleg semleges formában van jelen az enzim nyugalmi helyzetében.

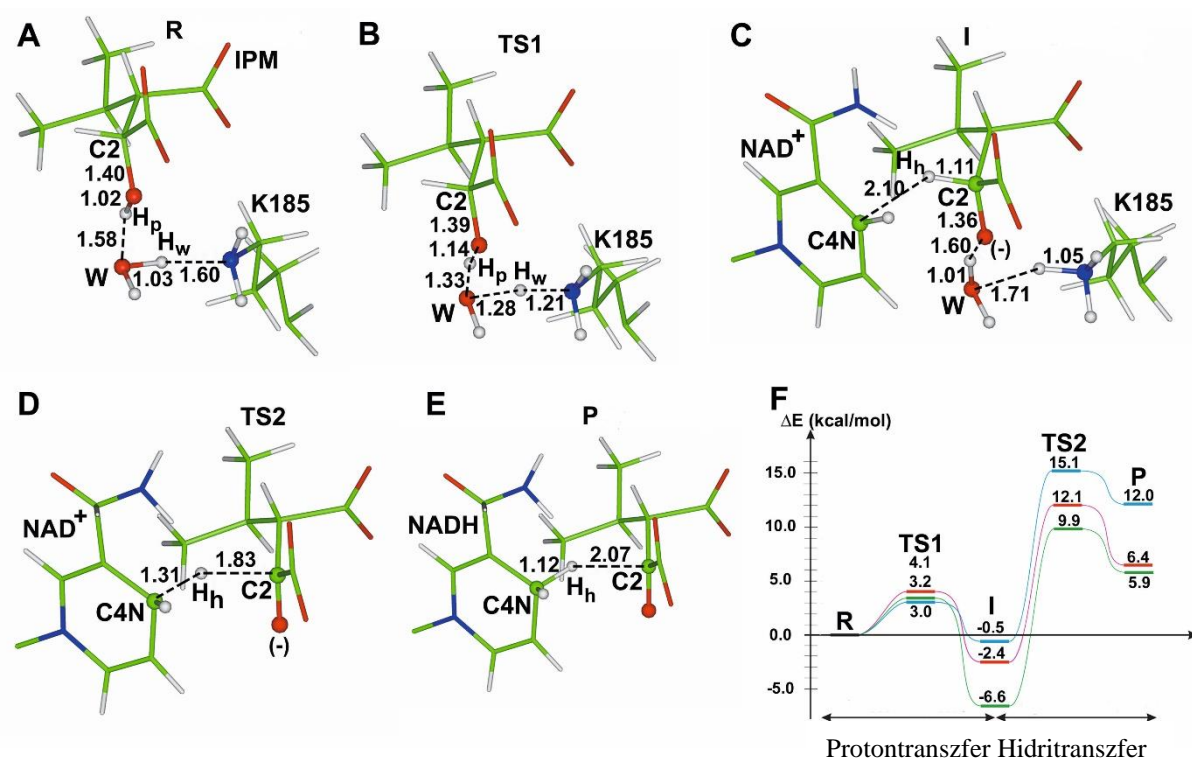


39. ábra (A) Az IPMDH enzim modellezése során a QM régióban szereplő oldalláncok. A QM régiót a ténylegesen jelölt atomok alkották, az IPM szubsztrátot pirossal, a NAD⁺ kofaktort kékkel jelöltem, valamint nyilak jelölik a proton- és hidridtranszfer reakciók irányát. (B) A Mg²⁺ iont tartalmazó rendszer potenciális energiahiperfelületének kétdimenziós metszete a B3LYP/6-31G^{*}//MM szinten

A QM/MM számítások végrehajtása előtt MD szimulációkat végeztünk a kristályszerkezeten, s kiválasztottunk egy olyan szerkezetet a trajektóriából, amely jó kiindulási szerkezetként szolgálhat a proton- és a hidridtranszfer folyamatok modellezéséhez. Felderítettük a hidrid- és protontranszfer folyamatokhoz tartozó PES kétdimenziós szegmensét. A protontranszfer reakció minden egyes reakciókoordináta értékénél meghatároztuk a hidridtranszfer reakcióprofilját, és a kapott energia értékekből megszerkesztettük a 39. ábra B részén látható felületet. Az ábra alapján kizárható, hogy a két folyamat egyszerre történjen meg, először a protontranszfer reakció játszódik le, s ennek gátja igen alacsony.

A fehérjék reaktivitását egyértelműen befolyásolja a konformációjuk, és gyakorlatilag lehetetlen előre tudni a szimulációk során, hogy melyik is a legalkalmasabb/legvalószínűbb konformáció a reakció lejátszódásakor. Ezért QM/MM számításoknál elterjedt megközelítés ennek figyelembevételére, hogy az MD trajektóriákból számos kiindulási szerkezetet választanak ki, s mindegyik esetében meghatározzák a reakció mechanizmusát, és összehasonlítják a kapott aktiválási energiákat. Mi is ezt tettük a kétdimenziós felület felderítése után: számítási igényeket és erőforrásainkat megfontolva 3 szerkezetet választottunk a trajektóriából és meghatároztuk az egyes lépések aktiválási energiáit. Noha elméletileg jó lenne, minél Az 40. ábra mutatja a meghatározott kritikus pontok szerkezetét, valamint a reakcióprofilokat. Látható, hogy a protontranszfer során egyszerre két proton is vándorol, a hidroxilcsoportról a katalitikus vízmolekulára, és annak egyik protonja tovább a K185'-ös aminosav aminocsoportjára. Az hidroxilátcsoportot tartalmazó intermedier energiája 0,5-6,6 kcal/mol-lal alacsonyabb a kiindulási komplexhez (R) képest. Ebből az köztitermékből indul el a hidridtranszfer, amely a reakció sebességmeghatározó lépése, gátja a három profil alapján 15-18 kcal/mol az I intermedierhez képest, amely jó összhangban van, más hasonló enzimekre becsült értékekkel, és azzal a ténnyel, hogy a reakció szobahőmérsékleten mérhető sebességgel játszódik le.

A Mg^{2+} és a Mn^{2+} tartalmú rendszer esetében meghatározott aktiválási és reakcióenergiák egyértelműen arra utalnak, hogy a két ion egymást könnyen helyettesítheti, teljes összhangban a kísérleti tapasztalatokkal. A Mg^{2+} ion tartalmú rendszer esetében a hidridion reakció aktiválási energiája a 3 profil esetében az intermedier állapothoz viszonyítva: 15,0, 16,6 és 18,3 kcal/mol-nak, míg a Mn^{2+} tartalmú rendszer esetében 14,5, 15,6 és 16,5 kcal/mol-nak adódott.



40. ábra Az IPMDH enzim által katalizált reakció kritikus pontjainak legfontosabb geometriai paramétereit a B3LYP/6-31+G**//MM szinten. A: R: reaktáns, B: TS1: A protonátadás átmeneti állapota C: I köztitermék D: TS2: a hidridtranszfer átmeneti állapota P: termék F: a Mg^{2+} -iont tartalmazó rendszer kritikus pontjainak relatív energiája az előzőekben meghatározott geometrián a B3LYP/6-311++G**//MM szinten. H_p és H_w az eredetileg az IPM ligandum OH-csoportjához, valamint a katalitikus víz molekulához tartozó hidrogénatomokat, míg H_h a hidridiont jelöli.

5.2. A káliumion szerepe a IMPDH enzim katalitikus aktivitásában [D11]

Prof. Vas Mária és csoportja számos mutánsát állították elő az IPMDH enzimnek. Ezek egyike volt az E270A mutáns, amelyben a 270-es glutaminsavat cserélték le alaninra. A röntgenszerkezet alapján a mutáns enzim a vad típusban található káliumion pozíciójában egy vízmolekulát tartalmazott. Meghatározták a mutáns enzim enzimkinetikai paramétereit, többek között a Michaelis-Menten kinetika során használt k_{cat} és K_m paramétereket. Ahhoz, hogy értelmezni tudjuk ezeket a mért értékeket QM/MM számításokat végeztünk.

Az összehasonlíthatóság kedvéért az előző tanulmányunkban meghatározott Mn^{2+} -ion tartalmú profilokat használtuk fel. A három profilhoz tartozó köztitermék szerkezetből indultunk ki, s mindegyikükben az E270-es aminosavat alaninnal helyettesítettük, a káliumiont

pedig eltávolítottuk. Meghatároztuk a hidridtranszfer reakció aktiválási energiáját a káliumion helyén a kristályszerkezetben megfigyelt vízmolekula jelenlétében és hiányában is.

10. táblázat A vad típusú és a E270A mutáns esetén a hidridtranszfer aktiválási energiái (kcal/mol) B3LYP/6-311+G//MM szinten, valamint a kísérletileg meghatározott Michaelis-Menten kinetikának megfelelő katalitikus konstansok (k_{cat} , min^{-1})

	vad típus		E270A
Modellezés – Hidridtranszfer aktiválási energiája (ΔE^\ddagger)			
Profil	K ⁺ jelen van	K ⁺ nincs, helyét víz foglalja el	Nincs se K ⁺ , se víz jelen
1	14,9	18,4	17,9
2	16,5	21,1	20,6
3	18,3	22,2	22,2
Kísérlet			
k_{cat} ^a K ⁺ hiányában	15,3 ± 4		0,95 ± 0,2
k_{cat} ^a telítési [K ⁺]	238 ± 30 ²³⁴		1,96 ± 0,3

^a k_{cat} (katalitikus konstans): adott enzimkoncentráció mellett egységnyi idő alatt átalakított szubsztrát molekulák számát adja meg

Az 10. táblázat mutatja a számított aktiválási energiákat és a kísérleti k_{cat} értékeket. A vízmolekula jelenléte/hiánya nem befolyásolta jelentősen az eredményeket. Ha összehasonlítjuk a vad típus és a E270A mutánsra számított aktiválási energiákat (víz jelenlétében), azt tapasztaljuk, hogy az aktiválási energia rendre 3,5, 4,6 és 3,9 kcal/mol-lal magasabb a mutáns szerkezet esetében. Az Arrhenius-egyenlet alapján az aktiválási energia 3–4 kcal/mol-os emelkedése 150–1000-szeres csökkenést okoz a reakciósebességben, amely ugyanabba a tartományba esik, mint a katalitikus konstans kísérletileg mért 121-250-szeres csökkenése. Mivel a számításaink csak az elektrosztatikus hatásokat vették figyelembe, a kísérleti és számítási eredmények közti nagyon jó összhang egyértelműen alátámasztja, hogy a káliumion elektrosztatikus hatása révén segíti elő a katalízist. Ugyanezt jelzi az is, hogy a mutánsban más a töltések eloszlása a nikotinamidgyűrűben. A vad típusban a hidridiont fogadó szénatom pozitívabb, így a hidridion felvétele könnyebb, az aktiválási energia ezzel összhangban kisebb, és a reakció pedig gyorsabb, mint a mutánsban.

11. táblázat A vad típusú rendszer és az E270A mutáns köztitermékében a NAD kofaktor nikotinamid gyűrűjének B3LYP/6-311+G*/MM szinten meghatározott Mulliken töltései elektronban

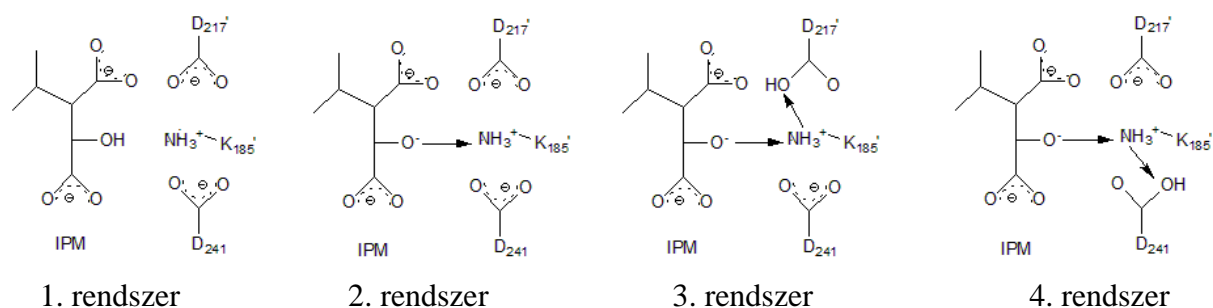
csoporthatár	vad típus	E270A (vízzel)
nikotinamid gyűrű amidcsoporttal	0,53	0,53
nikotinamid gyűrű	0,52	0,54
amid csoport	0,01	-0,01
C4N (hidridiont fogadó C atom)	-0,18	-0,13

5.3. További mutációk hatása az IMPDH enzim reaktivására [D12]

Prof. Vas Mária és kollégái az IPMDH enzim további mutánsait állították elő. A mért értékek értelmezéséhez először azt ellenőriztük le, hogy mennyire helytálló az a korábbi feltételezésünk, hogy a K185' lizin oldallánca semleges töltésű az enzim nyugalmi helyzetében. Ez azért volt fontos kérdés, mert a mérések alapján ez az oldallánc kulcsfontosságú a katalízis szempontjából, és feltételezésünk szöges ellentétben állt a molekuláris biológusok korábbi elképzeléseivel. Ugyanebbe az enzimesaládba tartozó malát-dehidrogenáz,²³⁵ 6-foszfoglukonát-dehidrogenáz,^{231,236,237} és az izocitrát-dehidrogenáz enzim^{238,239} esetében azt javasolták, hogy az enzim nyugalmi helyzetében protonált lizinoldallánc található.²⁴⁰ A feltételezés szerint a reakció kezdetén egy aszpartát oldallánc deprotonálja a lizint, és ez teszi lehetővé, hogy a lizin, mint általános bázis deprotonálhassa a ligandum β -helyzetű hidroxilcsoportját.

Sajnos a röntgen-diffrakciós szerkezetek nem tartalmaznak hidrogénionokat, így közvetlenül nem dönthető el a kérdéses aminosavak protonáltsági állapota. Feltételezhető viszont az, hogy a röntgenszerkezetben megfigyelt távolságok szoros kapcsolatban vannak az egyes csoportok protonáltságával, így helyes protonálódási mintázat esetén közel hasonló atomtávolságokat kell kapnunk, mint ami a kristályszerkezetben látható. Négy különböző rendszeren végeztünk molekuladinamikai szimulációkat (41. ábra). Az 1. rendszer felel meg az irodalomban rokon enzimekre leírt nyugalmi állapotnak (vagyis a K185'-ös lizin oldallánca protonált, D217' és D241 pedig deprotonált), a 3. és 4. rendszerek pedig annak az állapotnak, amikor az eredetileg protonált K185'-ös oldallánc átadja protonját D217' vagy D241-es aszpartát-oldalláncnak és átveszi az IPM ligandum hidroxilcsoportjának protonját. A 2. rendszer az általunk javasolt protonáltsági állapotnak felel meg. Az 5.1 fejezetben megmutattuk, hogy a protonvándorlás nagyon kis energiagáton keresztül valósulhat meg az

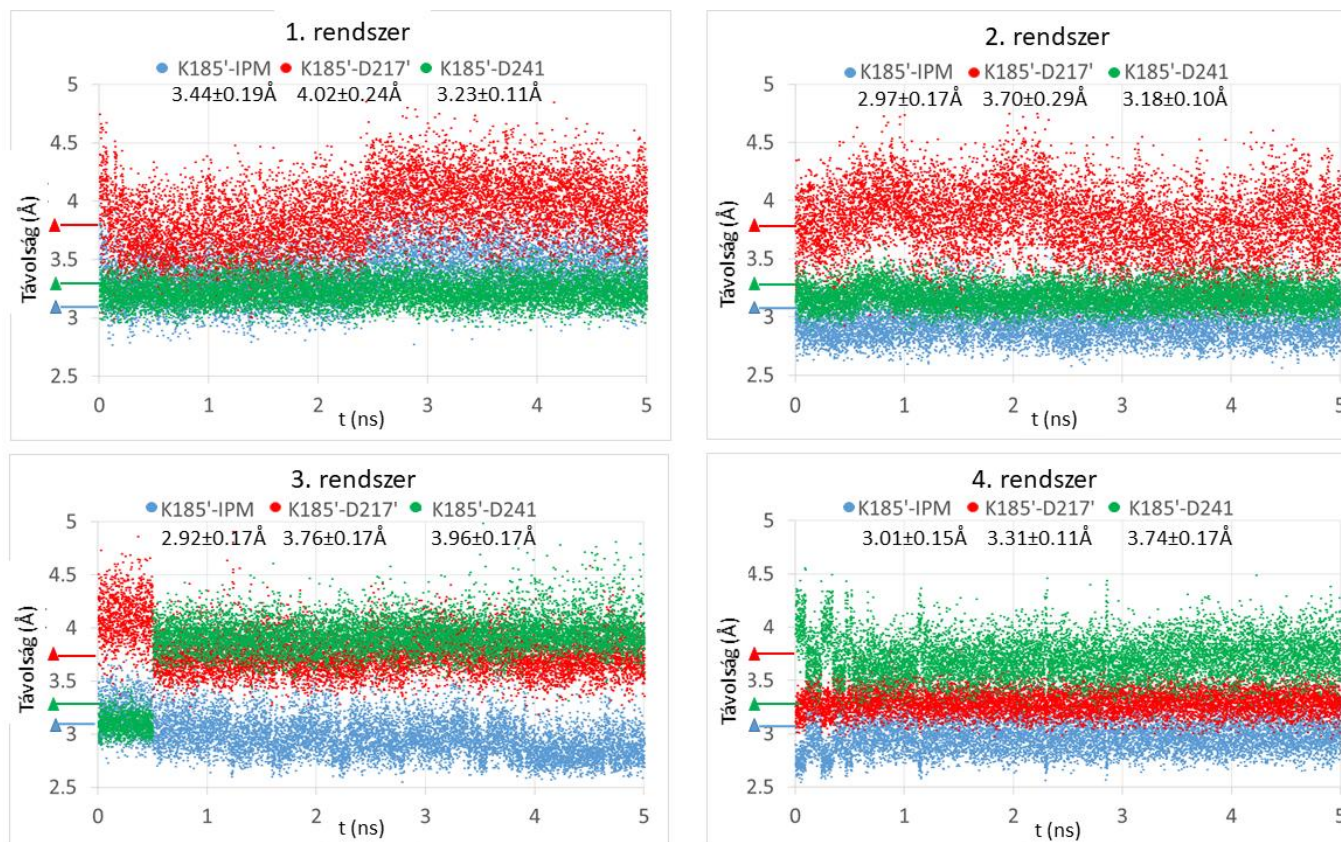
enzimben az IPM hidroxilcsoportjáról a semleges töltésű lizin oldalláncre, s valószínűsíthető, hogy ez azonnal megtörténik, amint az IPM beköt a fehérjébe. Ha ez igaz, akkor a kristályszerkezetben deprotonált hidroxilcsoportnak és protonált lizinoldalláncnak kell lennie, míg az aszpartát oldalláncok deprotonált formában maradnak. .



41. ábra MD szimulációkkal tanulmányozott rendszerek, amelyekben eltérően protonáltuk az IPM ligandum hidroxilcsoportját és a K185', D217' és D241 aminosavak oldalláncait.

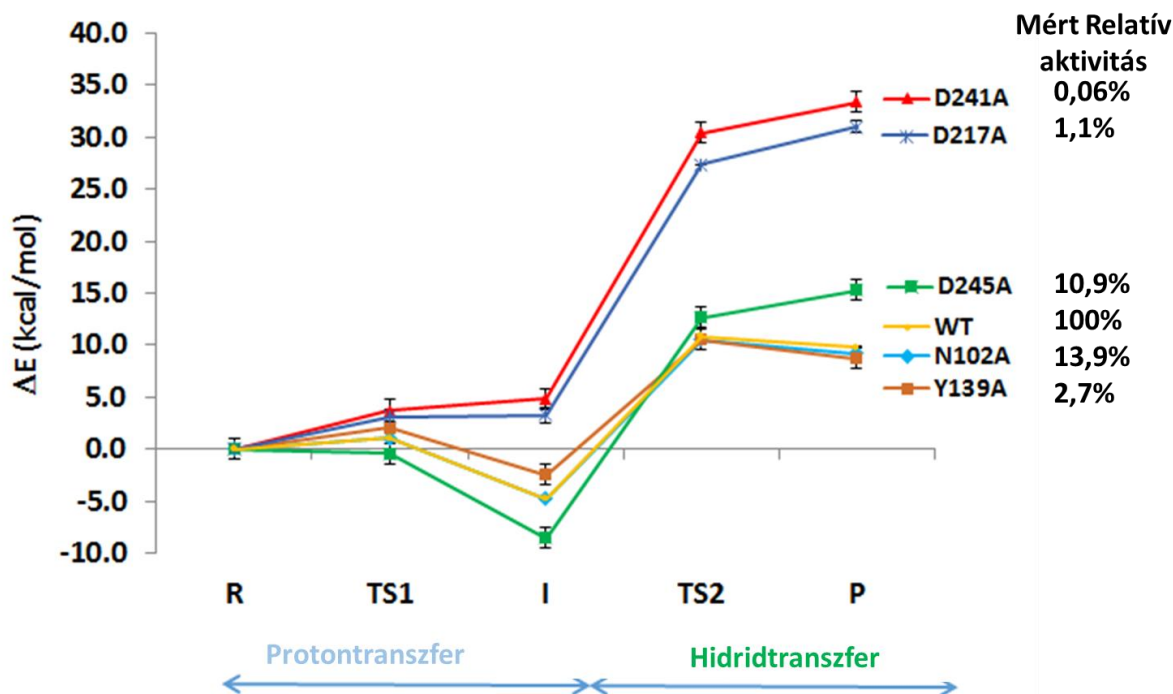
A 42. ábra alapján egyértelmű, hogy csak a 2. rendszerben mért távolságok vannak összhangban a kristályszerkezetben mért távolságokkal, a többi rendszer esetében felcserélődik a távolságok sorrendje és jelentős eltéréseket tapasztalunk a kísérleti adatokhoz képest. Az MD szimulációk erősen alátámasztják, hogy a K185'-ös lizinoldallánc semleges az enzym nyugalmi helyzetében, amikor az IPM szubsztrát még nem kötött be az aktív helyre, viszont felveszi annak protonját a szubsztrát bekötődése során.

Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy a mutált aminosavak milyen mértékben járulnak hozzá az enzym katalitikus hatásához, amihez a vad típus korábban 5.1 fejezetben bemutatott Mn^{2+} -iont tartalmazó reakcióprofiljait használtuk fel. Minden egyes állapotban (reaktáns, köztitermék, termék és átmeneti állapotok) meghatároztuk a rendszer energiáját a mutált oldallánc töltéseit kitörölve (differenciális átmeneti állapot analízis (differential transition state analysis) vagy ponttöltés kitörlési analízis (point charge deletion analysis)),^{241–245} hogy képet nyerjünk arról, hogy az adott oldallánc elektrosztatikus hatása révén milyen mértékben járul hozzá a katalízishez. Minél nagyobb a különbség a mutáns szerkezet és a vad típusú rendszer esetén számított aktiválási energia között annál fontosabb az adott aminosav a katalitikus reakció szempontjából.

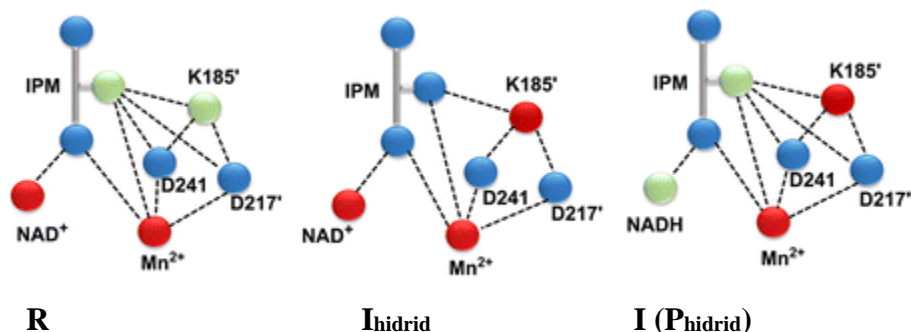


42. ábra Az MD szimulációk során a K185' lizin oldallánc ϵ -amino N atomja és az IPM hidroxil oxigénje (kék) vagy D217'-es aszparát oldallánc vagy a D241-es aszparát oldallánc (zöld) γ -szénatomja között. A diagram feletti számok az MD szimulációk utolsó két ns-jában mért távolságok átlagát is mutatják, és az y-tengely mentén a színes háromszögek a kristályszerkezetben mért távolságokat mutatják. A referencia értékek: a K185' oldallánc ϵ -amino N atomja és az (1) IPM hidroxilcsoportjának oxigénje között: (3.05–3.07 Å), (2) D217' oldallánc karboxilcsoportjának szénatomja között (3.60–3.73 Å), és (3) a D241-es oldallánc karboxilcsoportjának szénatomja között (3.23–3.38 Å).

Fontos tudnunk azonban, hogy a ponttöltések kitörlésével csak egy közelítő képet kapunk a mutációk hatásáról, hiszen az ilyen fajta analízis egyáltalán nem veszi figyelembe a mutáció hatását az enzim harmadlagos és negyedleges térszerkezetére.



43. ábra Mutáns enzimek mért relatív aktivitásai és az egyes állapotokra számított relatív energiák a B3LYP/6-31G*//MM szinten. Az enzimek aktivitása²³¹ az időegység alatt átalakított szubsztrátum mennyisége, a relatív aktivitás azt fejezi ki, hogy az adott mutáns, adott időegység alatt a vad típushoz (WT: 100%) képest, hány százaléknyi szubsztrátot alakít át. Akkor figyelhető meg összhang a mérési és számítási eredmények között ha a termék magasabb energiájához kisebb mért relatív aktivitás társul-



44. ábra Az IPMDH enzim vad típusában kialakuló legfontosabb elektrosztatikus kölcsönhatások sematikus ábrázolása. A különböző töltésű csoportokat eltérő színnel jelöltem: semleges: zöld, negatív töltésű: piros, pozitív töltésű: kék

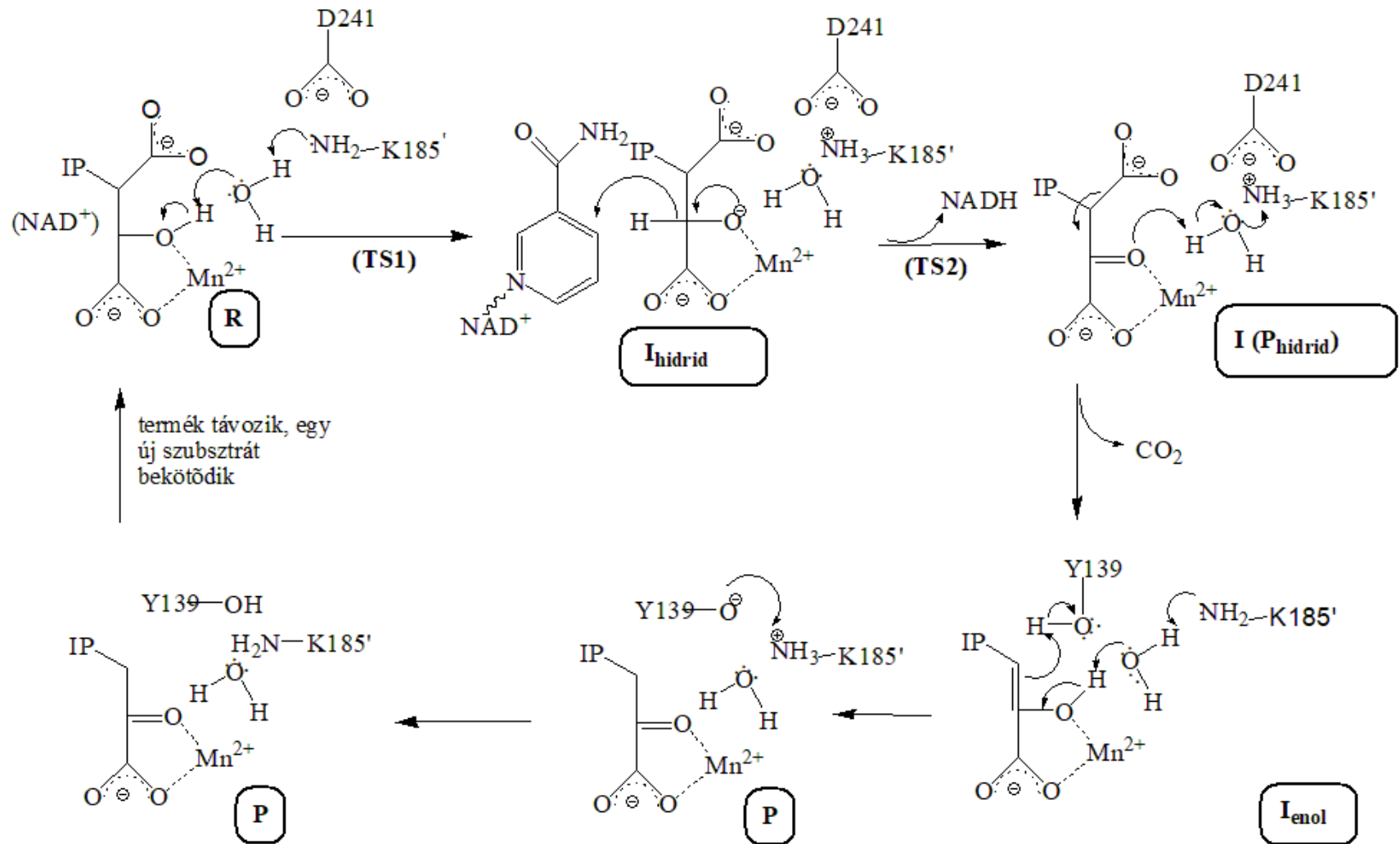
A 43. ábra a következő módon értelmezhető. Az egyes színekkel meghúzott vonalak egy adott mutáns esetén számított köztitermékek, átmeneti állapotok és a termék relatív energiáját mutatják a kiindulási állapothoz képest. A vad típus reakció profilját sárga szín jelöli. Három eset lehetséges: (1) a mutáns rendszerre számolt görbe nagyon hasonlít a vad típus görbéjéhez. Ekkor az adott aminosav nem befolyásolja elektrosztatikus kölcsönhatás révén a reakciót jelentősen. (2) A vad típushoz képest alacsonyabb energiák arra utalnak, hogy az adott oldallánc mutációja alaninná megkönnyíti a reakciót, vagyis az eredeti aminosav kedvezőtlenül befolyásolta a reakciót elektrosztatikus hatása révén. (3). A vad típushoz képest magasabb értékek azt jelentik, hogy az adott aminosav mutációja alaninná nehezíti a reakció lefutását, vagyis az eredeti aminosav elősegíti a katalízist elektrosztatikus hatása révén.

A kísérletek és a számítások is egyértelműen arra utalnak, hogy a D241 és a D217'-es aminosavak a legfontosabbak a reakció szempontjából, hiszen ekkor a legkisebb a mért relatív aktivitás és a legkevésbé stabil a termék. Valamivel kisebb a szerepe a D245-ös aszpartát oldalláncnak. Ezeknek a mutációknak az elektrosztatikus hatását a reakció lefolyására 44. ábra segít szemléltetni. Az enzim nyugalmi helyzetében a K185' aminosav semleges, és nincs kedvező kölcsönhatásban a D217' és D241-es aszpartát aminosavakkal. Azonban, amikor felveszi az IPM ligandum protonját, sóhidak alakulnak ki a D217' és D241-es aminosavakkal, ami elősegíti a **Ihidrid** köztitermék kialakulását és segíti a hidridtranszfert is. Amennyiben ezen aminosavak bármelyike helyett semleges töltésű alanin van jelen az enzimen, akkor a protonált lizinnel eggyel kevesebb negatív töltésű oldallánc tud kölcsönhatni, amely az intermedier (**Ihidrid**) relatív energiájának és a hidridtranszfer gátjának növekedéséhez vezet.

Az N102-es aszparaginoldallánc valamivel messzebb helyezkedik el és semleges töltésű, így nem meglepő, hogy a számítások szerint az elektrosztatikus hatása viszonylag kicsi a reakcióra. Egy fontos eltérés figyelhető meg a mérési és a számítási adatok között: a mérések alapján a Y139-es tirozin oldallánc jelentős hatással van a katalitikus reakcióra, míg a számítások ennek ellentmondanak. A tirozin csekély elektrosztatikus hatását a semleges karaktere magyarázza, ami nem befolyásolja jelentősen az általunk vizsgált oxidációs lépést. Ugyanakkor, ahogy a fejezet elején említettük, az oxidatív dekarboxiláció során az oxidációs lépést a dekarboxiláció követi. Azt gondoljuk, irodalmi adatokat is figyelembe véve²³¹, hogy ennek a tirozinoldalláncnak a szerepe a dekarboxilációs lépés során van jelentős, amelyet a számításainkban nem vizsgáltunk.

A három publikációnkban bemutatott eredmények alapján javaslatot tettünk az enzim katalitikus mechanizmusára, amely az alábbi ábrán (45. ábra) látható. Amint a szubsztrát beköt az aktív helyre (akár jelen van NAD, akár nincs) a hidroxilcsoport a protonját átadja a K185-ös

oldalláncnak, s ezt a folyamatot a D241-es aszpartát oldallánc elektrosztatikus hatása révén jelentősen elősegíti. Ezután következik a hidridtranszfer a megkötött NAD^+ kofaktorra, s így jön létre az **I** intermedier, ami valójában az oxidációs folyamat (**P_{hidrid}**) terméke A dekarboxilációs lépés során a proton visszavándorol a K185'-ös oldalláncról a hidroxilcsoportra, és egy enol keletkezik. Ez az enol újabb sav-bázis reakciókba lép a Y139-es tirozin- és a K185'-ös lizinoldalláncokkal, így létrejön a ketocsoportot tartalmazó termék. A protonált K185'-ös lizinoldallánc bázikus protonjának átadásával helyreállítja a Y139-es oldallánc nyugalmi helyzetét, a termék távozik, s újrakezdődhet a katalitikus ciklus.



45. ábra Javaslat az IPMDH enzim katalitikus ciklusára. Az IP jelölés az izopropilcsoportot jelenti.

6. Biomimetikus rendszerek vizsgálata

Az eddigiekben bemutatott tanulmányok mind arra irányultak, hogy megértsük a különböző fehérjék tulajdonságait: szerkezetüket és reaktivitásukat. Említettük, hogy a CYP enzimeket modellként használva mesterséges katalizátorokat is terveznek.¹⁰² Valóban, a természettudósok kíváncsiságát gyakran a folyamatok megértésen túlmutató motivációk is vezérlik. Ősidők óta szeretnénk céljaink elérése érdekében új anyagokat, rendszereket, eszközöket létrehozni.^{246–248} Gondolhatunk például az ősi kínaiakra, akik már 3000 évvel ezelőtt próbálkoztak mesterséges selyem előállításával, vagy Leonardo da Vincire, aki a madarak repülését tanulmányozva tett javaslatokat repülő tárgyak elkészítésére.

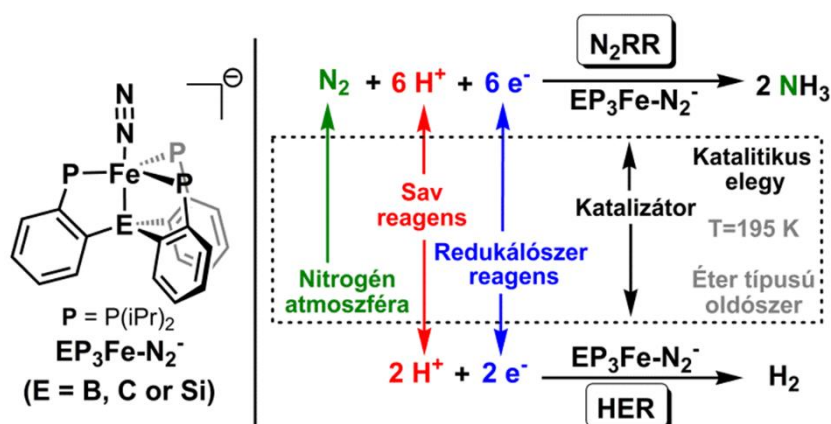
Az utóbbi évtizedek technológiai fejlődése forradalmasította a természetet utánzó anyagok tervezését és előállítását. A biomimetikus szó jelentése a Websters' szótár szerint: "biológiai úton képződő anyagok (pl. enzimek vagy selyem) képződésének, szerkezetének és funkciójának, valamint biológiai mechanizmusoknak és folyamatoknak (pl. fehérjeszintézis vagy fotoszintézis) a vizsgálata azzal a céllal, hogy mesterséges úton, természetet utánzó termékeket állítsunk elő". Érdeemes néhány példát is megemlítenünk: pl. a lótuszvirág ultrahidrofób tulajdonságait utánozva öntisztuló felületeket,²⁴⁹ a gekkók mászási technikáját tanulmányozva pedig falmászásra képes robotokat²⁵⁰ terveznek, a cápabőr pedig kis hidrodinamikus súrlódással rendelkező tárgyak, pl. egészsétes fürdőruhák mintájául szolgál versenyúszók számára, vagy repülő légellenállása is csökkenthető vele. A természetben fellelhető visszatükröző és tükröződésmentes felületek vizsgálata elősegíti hasonló felületek mesterséges előállítását is.

Ebben a témakörben két rendszerrel is foglalkoztam, egyrészt a fázistranszfer reakciókban használható koronaéterekkel[S16], a dolgozatban viszont csak a mesterséges nitrogénázhatású katalizátorok működését mutatom be, hiszen azok kapcsolódnak az átmenetifémekhez.

Az ammónia valószínűleg a modern társadalom egyik legnélkülözhetetlenebb mesterséges vegyülete. Napjainkban közel évi 150 millió tonnát gyártanak belőle (2017-es adat),²⁵¹ melynek túlnyomó részét a műtrágyagyártás alapanyagaként hasznosítják. Előállítására az iparban ritka kivételektől eltekintve kizárólag a Haber-Bosch eljárást alkalmazzák, amely még katalizátor alkalmazása mellett is csak többszáz °C-os hőmérsékleten és többszáz atmoszférányi nyomáson játszódik le elfogadható hatékonysággal. Ma a globális energiatermelés több mint 1%-át az ammóniaszintézis emészti fel, és felelős az üvegházhatású

gázok kibocsátásának körülbelül 3%-áért.²⁵² A klímaválság korában tehát egyre sürgetőbb egy alternatív, környezetbarátabb ipari eljárás kidolgozása.

Az fotokatalitikus²⁵³ és elektrokatalitikus nitrogénfixáció mellett²⁵⁴ az egyik legígéretesebb kutatási terület ebben a témában a biomimetikus molekuláris katalizátorok fejlesztése.²⁵⁵ Ezek olyan átmenetifém-komplexek, amelyek a természetes nitrogénáz enzim (nitrifikáló baktériumokban megtalálható fehérje, amely szobahőmérsékleten és standard légköri nyomáson képes a légköri nitrogént ammóniává alakítani) szerkezetét és működését utánozzák. A „szintetikus nitrogénázok” között is kiemelten figyelemre méltóak a Jonas Peters kutatócsoportja által kifejlesztett, négyfogú (**EP₃**, ahol E = B, C vagy Si) ligandum által koordinált vaskomplexek (46. ábra),^{256–258} amelyek a katalitikus aktivitást mutató rendszerek közül a legnagyobb hasonlóságot mutatják a természetes enzim aktívhelyével. A biomimetikus nitrogénfixálás folyamata az enzimmal analóg módon játszódik le: a vasatom képes egy dinitrogén molekulát – atmoszferikus nyomás mellett is - koordinálni, ami proton- és elektronaddíciók (azaz sav és redukálószer reagensekkel való reakciók) sorozatának eredményeképpen ammóniává redukálódik (46. ábra); az NH₃ molekulák leválását követően pedig újabb nitrogénkoordinációra nyílik lehetőség.



46. ábra A trifoszfino-borán/karbonil/szilil (**EP₃**) ligandum alapú szintetikus nitrogénázok szerkezete, valamint az általuk katalizált folyamatok és körülményeik. N₂RR: Dinitrogén redukációs reakció; HER: hidrogénfejlődési reakció

Sajnos, dacára a rengeteg kísérleti próbálkozásnak,^{258–260} a szintetikus katalizátorok átviteli száma^a igen alacsony (**BP₃Fe-N₂** (TON: 5-59) **CP₃Fe-N₂**: (TON: 4,4-36) **SiP₃Fe-N₂**: TON: 0,7-4). Ezek az értékek messze alulmúlják az iparban elvárt százezres nagyságrendű TON-értéket, amely ideális esetben végtelen lenne. Az eddig összegyűlt kísérleti tapasztalatok alapján ez két fő tényezőre vezethető vissza:

1. A biomimetikus katalizátorok nem szelektívek, ugyanis *HER* (hidrogénfejlődési reakció) aktivitással is rendelkeznek, azaz elősegítenek egy olyan mellékreakciót, amely során a savból és a redukálószerből H₂ keletkezik.

2. A biomimetikus katalizátorok az *N₂RR* (dinitrogén redukációs reakció) körülményei között hajlamosak inert vas-hidridekké alakulni, így a katalitikus aktivitás gyorsan csökken.

A fenti folyamatok mechanizmusának megértése szükséges a gyakorlatban is alkalmazható biomimetikus katalizátorok kifejlesztéséhez, azonban a reakcióelegy összetettsége és a legtöbb intermedierre jellemző rövid élettartam és alacsony koncentráció miatt az nem állapítható meg pusztán kísérleti adatokból (pl. *in situ* spektrumokból). A számításhoz kémia eszköztárával azonban feltérképezhetjük a lehetséges reakcióutakat és megállapíthatjuk a mellékreakciókhoz vezető kulcslépéseket, lefektetve ezzel a racionális katalizátortervezés alapjait.

A témában végzett kutatásaink során felvázoltuk a biomimetikus nitrogénfixálás reakcióelegyeiben elméletileg lehetséges összes elemi reakciót és reakcióutat, majd az azokban szereplő intermedierek és átmeneti állapotok szabadentalpiáját kiszámítva megállapítottuk a fő- és mellékreakciók legvalószínűbb lehetséges mechanizmusait. Végül mikrokinetikai modellezéssel szimuláltuk katalitikus elegyben lejátszódó reakciókat. Eredményeink alapján javaslatokat tettünk a katalizátor hatékonyságának növelésére.

Számítási módszerek

A számításokhoz az ORCA program csomagot használtuk. Először DFT funkcionálok megbízhatóságát vizsgáltuk a számított és kísérleti adatok összevetésével (röntgendiffrakciós szerkezetek, N-H kötési entalpiák, IR és Mössbauer spektroszkópiai paraméterek[D13]). Figyelembe véve a számítási módszerek erőforrásigényét, pontosságát, valamint a vizsgálandó vegyületek nagy számát a geometriaoptimalásokat és a másodikderivált számításokat a BP86

^a Átviteli szám (TurnOver Number, TON): Az egy katalizátorkomplexre jutó termékmolekulák (itt: NH₄⁺) száma a katalitikus folyamat végéig, amelyet vagy a reagensek elfogyása (sav és/vagy redukálószer), vagy pedig a katalizátor degradációja állít meg.

funkcionállal végeztük a ZORA-def2-SVP bázis felhasználásával. A 6.1 és 6.2 fejezetekben a végső single-point energiákat a B3LYP/ZORA-def2-TZVP szinten számítottuk tetrahidrofurán közeget szimuláló CPCM oldószermodellel. A 6.3 fejezetben a single-point számításokat a ω B97X-D3/ZORA-def2-TZVP szinten végeztük dietil-éteres közegben az SMD oldószermodell használatával. A relativisztikus hatásokat a ZORA módszerrel²⁶¹ és a diszperzió korrekciót a Grimme D3²² módszerével Becke-Johnson csillapítófüggvényt²¹ alkalmazva vettük figyelembe (kivéve az ω B97X-D3 módszerrel végzett számításokat). A kísérleti körülményeknek megfelelően termokémiai paramétereket 195 K-an és 1 atm nyomáson határoztuk meg. A számítások gyorsítása érdekében sűrűségillesztést (density fitting) alkalmaztunk a SARC/J segédbázis készletek felhasználásával (BP86: RI és hibrid funkcionálok: RIJCOSX). Az elektronátmenettel járó reakciók aktiválási energiáját a Marcus-egyenlet segítségével határoztuk meg. A kísérleteket számos különféle sav és redukálószer kombinációval végezték. A reakciók szabadentalpia-változásainak és aktiválási szabadentalpiáinak meghatározásakor protontranszfer reakciók esetén savként difenil-ammóniumiont (6.1. fejezet) vagy $[(\text{Et}_2\text{O})_2\text{H}]^+$ -t (6.2 és 6.3 fejezet) használtunk, redukáló szerként pedig dekametil-kobaltocént (6.1. fejezet) vagy KC_8 -t (6.2 és 6.3 fejezet).

6.1. A biomimetikus nitrogénfixáció szabadentalpia-profilja [D13]

Először a dinitrogén redukciós reakció (N_2RR) szabadentalpia-profilját térképeztük fel. Az eddig leghatékonyabbnak ($\text{BP}_3\text{Fe-N}_2^-$) és legkevésbé hatékonynak ($\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2^-$) bizonyuló katalizátorból kiindulva kiszámítottuk az összes, ammónialeváláshoz és újabb aktív katalizátorkomplex keletkezéséhez vezető reakcióút termodinamikáját, azzal a kísérleti adatok alapján szabott megkötéssel, hogy nem keletkezhet többszörös töltésű intermedier. Természetesen a szabadentalpiaváltozás erősen függ az alkalmazott reagensek (sav, redukálószer) minőségétől; számításaink során difenil-ammóniumion protonforrást és dekametil-kobaltocén elektronforrást feltételeztünk, ugyanis ezekkel a reagensekkel érték el kísérletileg eddig a legnagyobb átviteli számot.²⁶⁰

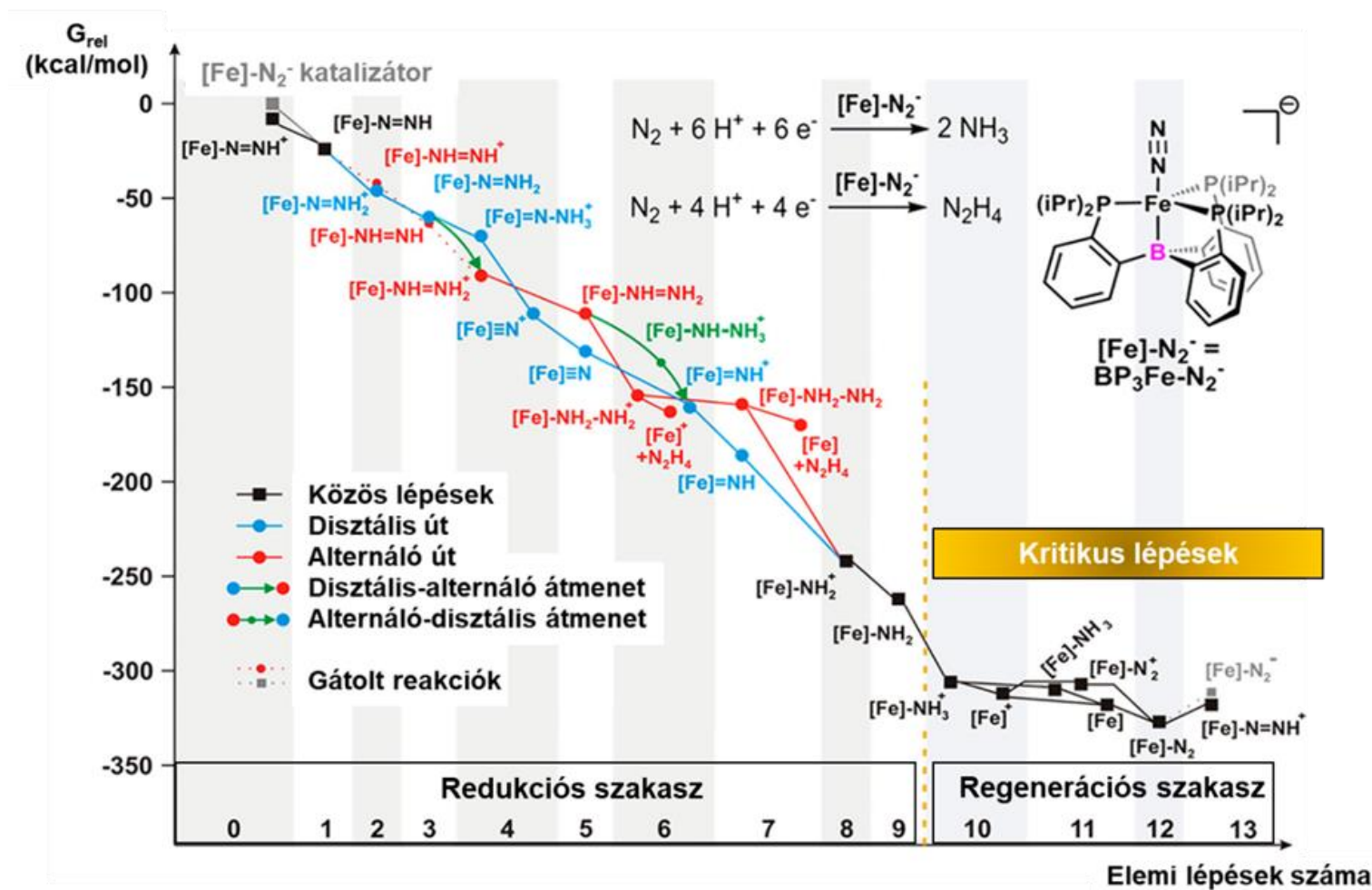
A jelentős szabadentalpia-növekedéssel járó, ezért igen valószínűtlen elemi reakciókat kizárva megkaptuk a katalitikus reakció szabadentalpia-profilját (47. ábra és 48. ábra). A kapott görbéket a heterogén katalízisben ismert Sabatier-elv segítségével értékelhetjük. Az elv szerint egy ideális katalizátoron a szubsztrát nem kötődhet túl gyengén, de túl erősen sem – homogén esetre úgy fogalmazhatjuk át ezt a követelményt, hogy ne legyenek sem kiugróan alacsony, sem

kiugróan magas szabadentalpia-változással járó lépések, azaz a termodinamikai hajtóerő eloszlása legyen egyenletes. Ez nem figyelhető meg az ábrákon: a katalitikus ciklusnak két, eltérő lefutású szakasza különböztethető meg, amelyek között a határ a $\text{BP}_3\text{Fe-NH}_3^+ / \text{SiP}_3\text{Fe-NH}_3^+$ köztitermékekénél van.

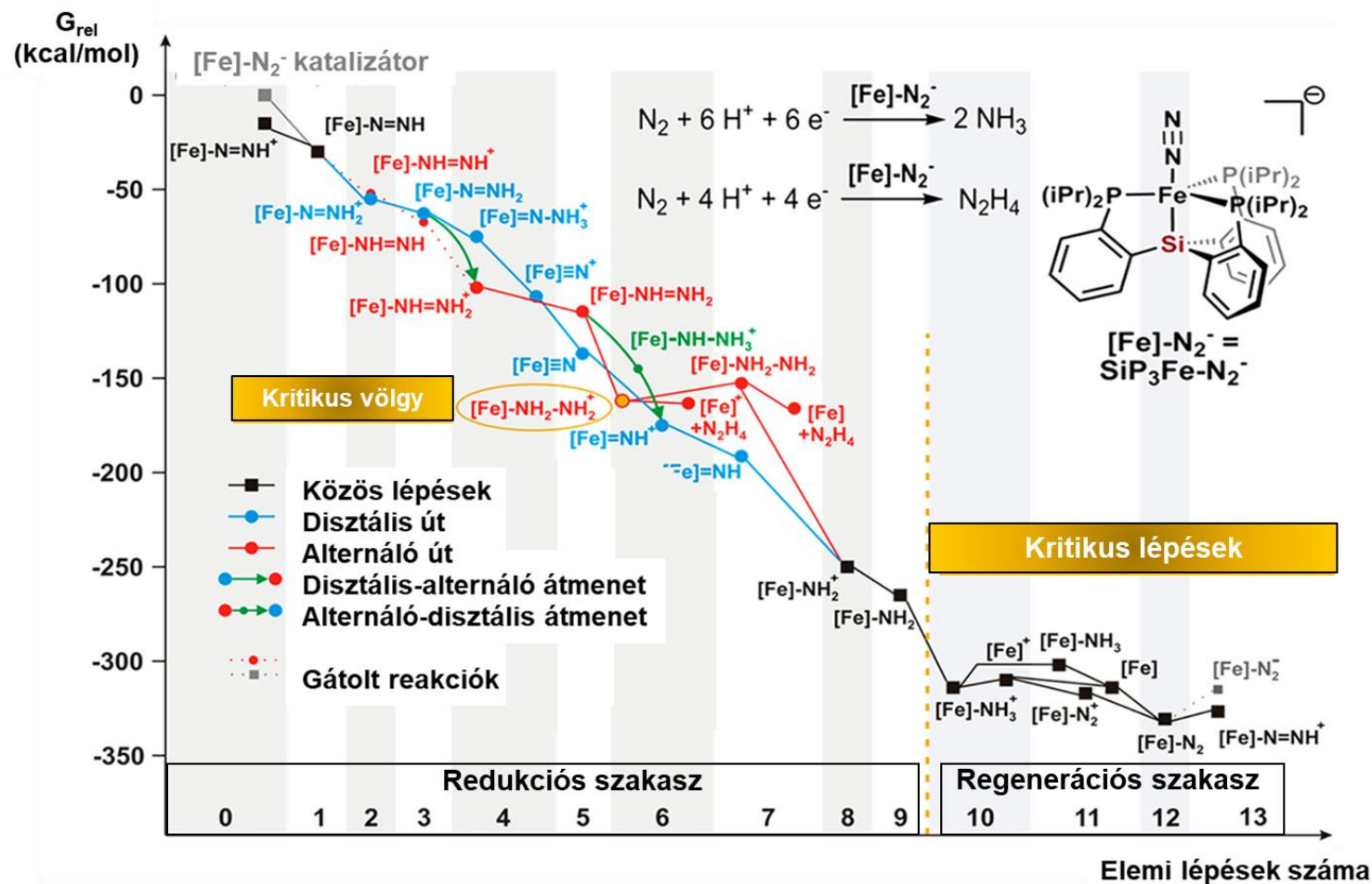
Az első, redukciós szakaszban a megkötött nitrogénmolekula redukciója játszódik le, amely két fő úton mehet végbe. Az ábrán késsel jelölt disztális úton (a vastól távolabbi nitrogén ammóniává redukálódik, ezt követi a közelebbi N atom redukciója: $\text{BP}_3\text{Fe-N}_2^- \rightarrow \text{BP}_3\text{Fe}\equiv\text{N} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{BP}_3\text{Fe-NH}_3^+ + \text{NH}_3$) a szabadentalpia folyamatosan és egyenletesen csökken, ami arra utal, hogy az itt szereplő intermedierek akadálytalan, gyors egymásba alakulására számíthatunk. Ez azt is jelenti, hogy a katalitikus ciklusnak ez a része nem segíti az esetleges mellékreakciók megjelenését. A pirossal jelölt alternáló útvonal (a vastól távolabbi és a vashoz közelebbi nitrogén redukciója felváltva történik: $\text{BP}_3\text{Fe-N}_2^- \rightarrow \text{BP}_3\text{Fe-NH}_2\text{-HN}_2^+ \rightarrow \text{BP}_3\text{Fe-NH}_3^+ + \text{NH}_3$) várhatóan háttérbe szorul a disztálissal szemben, mivel abban a szabadentalpia lefutása egyenetlenebb: jelentősnek tekinthető és zérus közeli szabadentalpia-változások váltják egymást.

A katalízis második szakaszában (regenerációs szakasz, $\text{BP}_3\text{Fe-NH}_3^+ \rightarrow \text{BP}_3\text{Fe}^{+0} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{BP}_3\text{Fe-N}_2^{+/0-}$) a második ammóniamolekula leválása és a következő nitrogénmolekula koordinációja történik meg. Mivel a $\text{BP}_3\text{Fe-NH}_3^+ / \text{SiP}_3\text{Fe-NH}_3^+$ köztitermék keletkezéséig bezárólag a bruttó reakcióból ($\text{N}_2 + 6 \text{H}^+ + 6 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{NH}_3$) kinyerhető összes termodinamikai hajtóerő elfogy, ebben a fázisban elkerülhetetlen a termoneutrális és endergonikus reakciók megjelenése. A Brønsted-Evans-Polányi-elv, valamint termokémiai megfontolások alapján várhatóan ezek az N_2RR folyamat sebesség-meghatározó lépési, s az itt keletkező intermedierek halmozódhatnak fel a reakcióelegyben, és lehetnek a *HER* ciklusok, illetve deaktiválódási mechanizmusok valószínű kiindulópontjai.

A regenerációs szakasz transzformációinak kritikus lépésként való azonosítását, a szabadentalpia-profil ellaposodását és az $\text{BP}_3\text{Fe-N}_2$ intermedierhez tartozó jól meghatározott szabadentalpia-minimum létezését – kísérleti megfigyelések is megerősítik. Mössbauer-spektrószkópiával követték az N_2 redukcióját BP_3Fe katalizátor, difenil-ammóniumion protonforrás és dekametil-kobaltocén elektronforrás jelenlétében, és a Fe atomok többsége 30 perc után dinitrogén komplexként ($\text{BP}_3\text{Fe-N}_2$) volt jelen. Rajta kívül csak a BP_3Fe^+ szerkezetet tudták azonosítani.²⁶² Az, hogy a $\text{BP}_3\text{Fe-N}_2$ és BP_3Fe^+ intermedierek kimutathatóak a katalitikus elegyben jelzi hosszú élettartamukat, és, hogy az átalakulásuk termodinamikai hajtóerejének kicsi. A dinitrogén komplex uralkodó jelenléte stabilitására utal, egyetértésben azzal, hogy egy jól meghatározott minimumban helyezkedik el a szabadentalpia-profilban.



47. ábra A biomimetikus ammóniaszintézis szabadentalpia-profilja. Az egyes intermedierek jelölésében az [Fe] szimbólum az ábrán látható BP_3 ligandum és központi vasatom egységét jelöli. A 10-13. lépésnél látható a profil „ellaposodása”, azaz a termodinamikai hajtóerő megszűnése. „Gátolt reakciók”: kísérleti adatok alapján kinetikailag gátolt folyamatok.



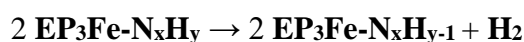
48. ábra A biomimetikus ammóniaszintézis szabadentalpia-profilja. Az egyes intermedierek jelölésében az [Fe] szimbólum az ábrán látható SiP₃ ligandum és központi vasatom egységét jelöli. A 10-13. lépésnél látható a profil „ellaposodása”, azaz a termodinamikai hajtóerő megszűnése. „Gátolt reakciók”: kísérleti adatok alapján kinetikailag gátolt folyamatok.

A szabadentalpia-profil néhány utolsó lépese esetén a szabadentalpia változása elhanyagolható, ezen jelleg azonban nemcsak a Peters-féle rendszer esetén figyelhető meg, Schrock molibdéntartalmú mesterséges nitrogénáz komplexén végzett DFT-tanulmányok is hasonlóan egyenetlen hajtóerő-eloszlást mutattak.^{263,264}

A racionális katalizátortervezés céljaként azt lehet tehát megjelölni, hogy – mivel a bruttó reakcióból eredő termodinamikai hajtóerő adott – a ligandum módosításával azt kell elérni, hogy a katalízis első szakaszából származó szabadentalpia-felszabadulás jelentősen csökkenjen, hogy az utolsó lépésekben megnövekedhessen a reakció hajtóereje.

6.2. Képesek-e a biomimetikus nitrogénfixáció intermedierjei egymással reagálni? [D14]

A Jonas Peters-féle kutatócsoport TPSSh funkcionállal végzett számításaik alapján azt vetette fel, hogy az **EP₃Fe** típusú nitrogénázok alacsony szelektivitása arra vezethető vissza, hogy egyes *N₂RR* intermedierekben különösen gyenge az N-H kötés.²⁶⁵ Ez lehetőséget ad arra, hogy két közttermék találkozásakor, két N-H kötés felszakadásával H₂ molekula keletkezzen (bimolekuláris *HER*).²⁶⁵

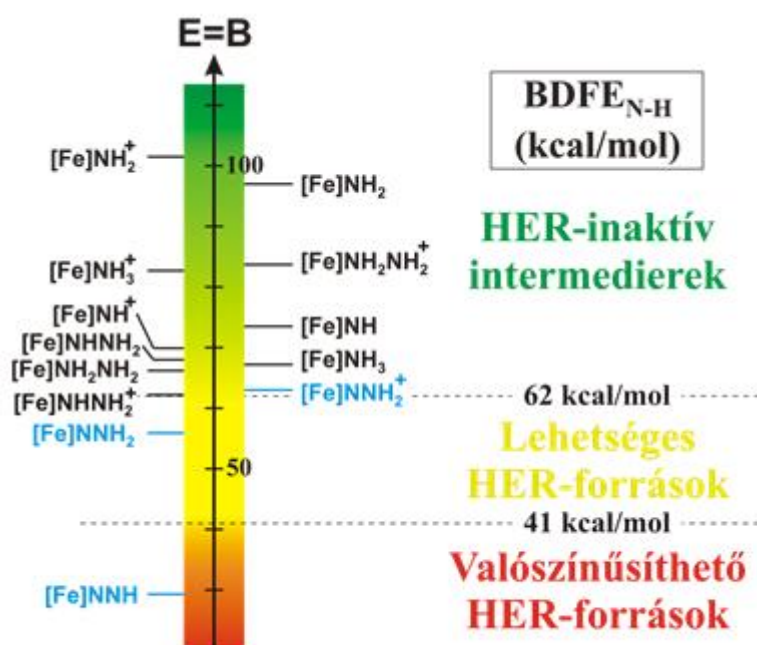


A fenti folyamatot a katalizátor protonálásával *in situ* előállított **EP₃Fe-NNH** komplexek esetén kísérletileg is megfigyelték.²⁶⁶ Ugyanakkor ez az elmélet ellentétben áll azzal a következtetésünkkel, hogy a mellékreakciók várhatóan a regenerációs szakasz során indulhatnak el.

Ezért a bimolekuláris *HER* vizsgálatához egy két lépéses eljárást alkalmaztunk. Először a validált protokollunkkal kiszámítottuk az N-H kötést tartalmazó *N₂RR*-intermedierek kötődisszociációs szabadentalpiáit, és ez alapján kiválasztottuk a bimolekuláris *HER* legvalószínűbb forrásait, azaz a leggyengébb N-H kötésekhez tartozó szerkezeteket. Második lépésben a kiválasztott intermedierek reaktivitását vizsgáljuk meg részletesen az egymással versengő *HER*- és *N₂RR* lépések aktiválási szabadentalpiájának összehasonlításával. Amennyiben a bimolekuláris *HER* reakciók legalább egyikének gátja lényegesen alacsonyabb, mint az ugyanazon intermedierből kiinduló *N₂RR* elemi lépés, az a bimolekuláris *HER*-utak újabb bizonyítékának tekinthető. Ezzel ellentétben, ha az összes lehetséges hidrogénfejlődési folyamat gátja meghaladja az *N₂RR*-ét, kétségessé válik a „bimolekuláris *HER*” hipotézis.

Először azonosítottuk azokat a $\text{BP}_3\text{Fe-N}_2^-/\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2^-$ katalizátorból származtatható N_2RR intermediereket, amelyekben található a bimolekuláris HER lejátszódásához eléggé instabil N-H kötés. Ehhez a számított N-H kötésdisszociációs szabadentalpiákat ($\text{BDFE}_{\text{N-H}}$) kísérleti referenciákkal hasonlítottuk össze: a bizonyítottan HER -aktív $\text{SiP}_3\text{Fe-CN}^{\text{H}}$ komplexre ($\text{BDFE}_{\text{N-H}} = 41 \text{ kcal/mol}$) és a bizonyítottan HER -inaktív $\text{SiP}_3\text{Fe-CN}^{\text{H}^+}$ komplexre ($\text{BDFE}_{\text{N-H}} = 62 \text{ kcal/mol}$) mért értékekkel. Adataink szerint (49. ábra) két esetet kivéve ($\text{BP}_3\text{Fe-NNH}$, $\text{BP}_3\text{Fe-NNH}_2$) termodinamikai megfontolások alapján kizárható a bimolekuláris HER -mechanizmus.

A következő lépésben meghatároztuk a két fenti intermedierből ($\text{BP}_3\text{Fe-NNH}$, $\text{BP}_3\text{Fe-NNH}_2$), valamint a Peters-csoport által HER prekuzornak javasolt $\text{BP}_3\text{Fe-NNH}_2^+$ komplexből eredeztethető összes lehetséges bimolekuláris HER reakció aktiválási szabadentalpiáját (12. táblázat). A HER reakció számított gátjai messze meghaladják az N_2RR ciklus részét képező proton- és elektrontranszferek gátjait. Bár az utóbbi esetén a számításainkat a leggyakrabban alkalmazott sav-redukálószer pár, azaz $[(\text{Et}_2\text{O})_2\text{H}]^+$ és KC_8 reagenseket alapul véve végeztük, azonban az aktiválási szabadentalpiák közti különbség olyan nagy mértékű, hogy a fenti állítás valószínűsíthetően minden reakcióelegyre érvényes. A kapott adatok alapján kijelenthető, hogy a korábban javasolt N-H-disszociáció alapú HER mechanizmus kinetikailag gátolt az ammóniaképződéssel járó főreakcióval szemben.



49. ábra A $\text{BP}_3\text{Fe-N}_2^-$ katalizátorból származtatható N_2RR intermedierek kötésdisszociációs szabadentalpiája ($\text{BDFE}_{\text{N-H}}$), HER -aktív referenciavegyülettel ($\text{SiP}_3\text{Fe-}$

CNH, $BDFE_{N-H} = 41$ kcal/mol) és *HER*-inaktív referenciavegyülettel ($SiP_3Fe-CNH^+$, $BDFE_{N-H} = 62$ kcal/mol) összevetve. A Peters-csoport által valószínűsített *HER*-forrásokot késsel jelöltük.

12. táblázat *HER*-forrásként szóba jöhető N_2RR intermedierek (fejléc) lehetséges reaktivitásai, az egyes reakciók szabadentalpiái (ΔG , kcal/mol) és aktiválási szabadentalpiái (ΔG^\ddagger , kcal/mol). *PT*: protontranszfer, *ET*: elektrontranszfer.

		BP₃Fe-N=NH		BP₃Fe-N=NH₂⁺		BP₃Fe=N-NH₂	
		BDFE _{N-H} = 29 kcal/mol		BDFE _{N-H} = 63 kcal/mol		BDFE _{N-H} = 56 kcal/mol	
Reakciótípus		ΔG^0	ΔG^\ddagger	ΔG^0	ΔG^\ddagger	ΔG	ΔG^\ddagger
<i>Bimol.</i> <i>HER</i>	BP₃Fe-N=NH partnerrel	-65	18^a	-36	34^c	-40	31^c
	BP₃Fe-N=NH₂⁺ partnerrel	-36	34^c	-7	59^a	-11	50^c
	BP₃Fe=N-NH₂ partnerrel	-40	31^c	-11	50^c	-15	42^a
<i>N₂RR</i>	PT disztális N-re	-16	7^a	-	-	-7	13^a
	PT proximális N-re	-	-	-	-	-27	14^a
	ET	-	-	-37	4^b	-	-
		SiP₃Fe-N=NH		SiP₃Fe-N=NH₂⁺		SiP₃Fe=N-NH₂	
		BDEF _{N-H} = 29 kcal/mol		BDFE _{N-H} = 60 kcal/mol		BDFE _{N-H} = 52 kcal/mol	
Reakciótípus		ΔG^0	ΔG^\ddagger	ΔG^0	ΔG^\ddagger	ΔG^0	ΔG^\ddagger
<i>Bimol.</i> <i>HER</i>	SiP₃Fe-N=NH partnerrel	-67	12^a	-39	32^c	-43	29^c
	SiP₃Fe-N=NH₂⁺ partnerrel	-39	32^c	-11	53^a	-15	47^c
	SiP₃Fe=N-NH₂ partnerrel	-43	29^c	-15	47^c	-20	40^a
<i>N₂RR</i>	PT disztális N-re	-21	8^a	-	-	-9	11^a
	PT proximális N-re	-	-	-	-	-36	12^a
	ET	-	-	-30	6^b	-	-

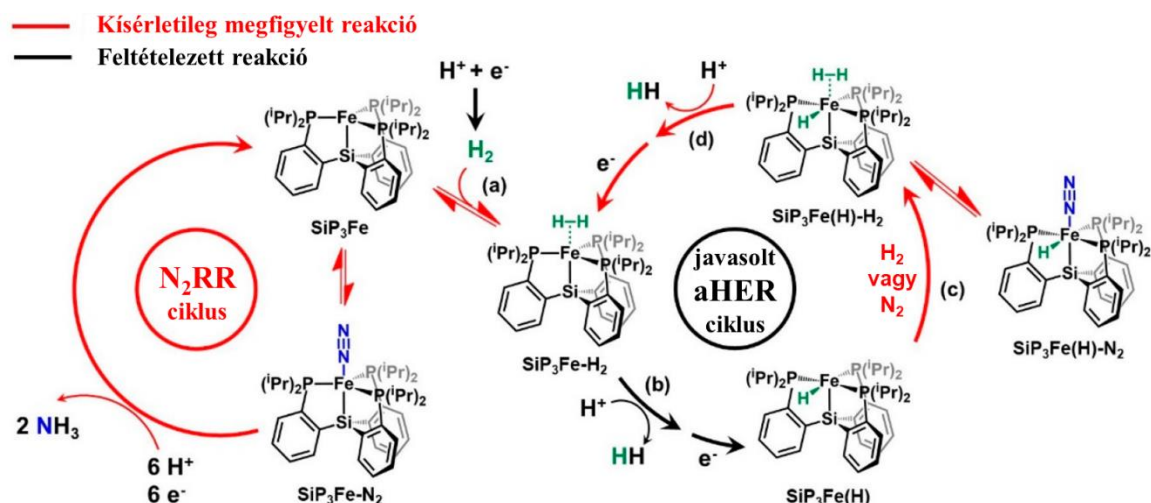
^a Az átmenetiállapot-elmélet alapján számítva ^b A Marcus-elmélet alapján számítva ^c A Brønsted-Evans-Polányi elv alapján számítva

Alternatív *HER*-mechanizmusként a deaktiválódás folyamata során kialakuló Fe-H kötés bomlása vehető fel. A vas-hidrid alapú *HER* elemi lépésekre lebontott reakcióútjára vonatkozó eredményeinket a következő alfejezetben tárgyalom.

6.3. Az autokatalitikus *HER* hipotézis [D15]

A bimolekuláris *HER* kinetikai gátoltsága és a Peters-féle nitrogenázok vas-hidrid származékainak reaktivitása adta azt az ötletünket, hogy a *HER* és a katalizátor-deaktiválódás az Fe-H kötésen keresztül összefügg. Összegyűjtöttük az elméletileg lehetséges hidrideket és Fe-H₂ komplexeket tartalmazó reakciósorokat, és meghatároztuk az aktiválási szabadentalpiákat. Végül mikrokinetikai modellezés segítségével (amikor is megoldottuk a reakcióhálózatra felírt sebességi egyenletek rendszerét) megpróbáltunk betekintést nyerni a katalitikus elegy tulajdonságaiba, megfigyelni a (közti)termékek koncentrációjának időbeli alakulását és tanulmányozni a reagensek és a katalizátor arányának hatását a katalitikus reakció kimenetelére. (**SiP₃Fe-N₂**⁻ és származékai)

A szilíciumtartalmú rendszert választottuk ki, mert ez a legkevésbé hatékony katalizátor (ennek legkisebb az átviteli száma (**BP₃Fe-N₂**⁻ (TON: 5-59) **CP₃Fe-N₂**⁻:(TON: 4,4-36) **SiP₃Fe-N₂**⁻ TON: 0,7-4)), emiatt várhatóan itt a leggyorsabb a katalizátor deaktiválódás és legjelentősebb a hidrogénfejlődés. Ráadásul számos hidridformája ismert, ami lehetőséget adott arra, hogy számításainkat közvetlen kapcsolatba hozzuk a kísérleti eredményekkel.^{267,268} A következő tények ismertek. (1) Az összes *N₂RR*-intermedier közül a semleges dinitrogén komplex (**SiP₃Fe-N₂**) hajlamos leginkább felhalmozódni a reakcióelegyben.²⁶⁹ (2) Az **SiP₃Fe-N₂** komplex hidrogén atmoszféra alatt dihidrogén komplexszé (**SiP₃Fe-H₂**) alakítható.²⁷⁰ (3) Oldatfázisban az N₂/H₂ ligandumcsere egyensúlyi állandója alapján az **SiP₃Fe-H₂** forma stabilabb, mint az **SiP₃Fe-N₂**.²⁷⁰ (4) Létezik spontán (háttér) *HER*, vagyis katalizátor hiányában savból és redukálószerből hidrogén fejlődik. (5) Ha **SiP₃Fe-N₂**⁻ jelen van, a háttér *HER*-hez képest jóval több hidrogén fejlődik. Mindezeket figyelembe véve vetettük fel az autokatalitikus *HER*-ciklust (*aHER*), amely a 50. ábra mutat.

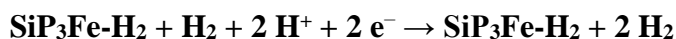


50. ábra Az $\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2$ -nitrogenáz származékainak kísérletileg igazolt és feltételezett reakciói. A könnyebb áttekinthetőség érdekében csak a katalitikus HER folyamat szempontjából leglényegesebb intermedierek semleges alakját tüntettem fel. (a) Dihidridképződés a háttérhidrogén Fe centrumhoz történő koordinációja révén. (b) Protonálódás az egyik Fe-H kötésen, amely hidrogénleválást eredményez. Az ezt követő redukció terméke a semleges monohidrid ($\text{SiP}_3\text{Fe(H)}$). (c) A monohidridből H_2 koordinációjával trihidrid ($\text{SiP}_3\text{Fe(H)-N}_2$), N_2 koordinációjával pedig stabil, katalitikusan inaktív hidrid ($\text{SiP}_3\text{Fe(H)-N}_2$) keletkezik. (d) A trihidrid protonálódásával ismét H_2 válik le, és a kezdeti dihidrid pozitív töltésű formája marad vissza. Egy végső, redukciós lépés zárja az aHER-ciklust.

Kezdetben az N_2RR elegyben nincs H_2 , viszont sav és redukálószer jelenlétében gyakorlatilag elkerülhetetlen a spontán H_2 fejlődés (ez a háttér HER). Az így képződő H_2 verseng az N_2 -vel a vas üres koordinációs helyéért, és ki tud alakulni a $\text{SiP}_3\text{Fe-H}_2$ komplex (50. ábra, (a)). Amennyiben ilyen körülmények között létrejön a dihidrid, az a 50. ábra (b)-(d) reakciósora révén megnyithatja az utat a katalitikus hidrogénfejlődés és az $\text{SiP}_3\text{Fe(H)-N}_2$ stabil hidrid képződése felé.

A kísérletileg megfigyelt hidridek protonálásának mintája alapján feltételezhetjük, hogy $\text{SiP}_3\text{Fe-H}_2$ is képes a savval reakcióba lépni: ekkor az egyik vashoz kapcsolódó hidrogénatom az érkező protonnal együtt H_2 formájában távozik és $\text{SiP}_3\text{Fe(H)}^+$ marad vissza (50. ábra (b)).^{270,271} Ezt a pozitív töltésű monohidridet nem írták még le az irodalomban, az azonban korábbi kísérletekből tudható, hogy a redukált forma – a semleges $\text{SiP}_3\text{Fe(H)}$ – a képződése után azonnal megköt egy N_2 vagy H_2 molekulát attól függően, hogy milyen atmoszférával érintkezik.²⁷¹ A vizsgált katalitikus elegyben ez alapján elsősorban $\text{SiP}_3\text{Fe(H)-N}_2$ kialakulása várható, de mivel spontán képződő H_2 jelenléte elkerülhetetlen, $\text{SiP}_3\text{Fe(H)-H}_2$ képződésével is

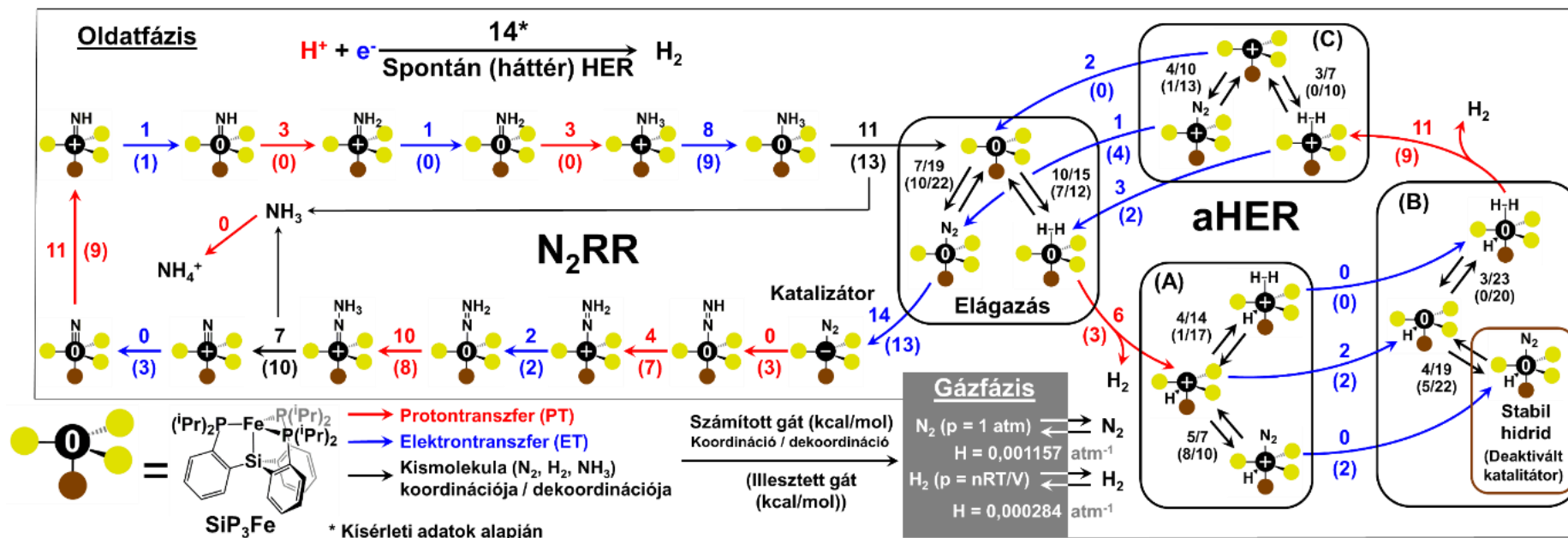
számolni kell (50. ábra, (c)). A lehetséges termékek közül a dinitrogén komplex stabil és nem alakul tovább,²⁶⁹ a trihidrid reaktivitása pedig ismert: hidrogénfejlődést eredményezve protonálódik, és pozitív töltésű dihidridet ($\text{SiP}_3\text{Fe-H}_2^+$) képez.²⁷¹ Innen már csak egyetlen redukciós lépés szükséges ahhoz, hogy visszakapjuk az $\text{SiP}_3\text{Fe-H}_2$ -t (50. ábra, (d)). Összegezve az alábbi bruttó egyenlettel jellemezhetjük a katalitikus hidrogénfejlődés feltételezett mechanizmusát:



A szilíciumtartalmú Fe-nitrogenáz $\text{SiP}_3\text{Fe-H}_2$ formája felgyorsítja a hidrogénfejlődést. A ciklus beindulásához 1 H_2 , 2 H^+ és 2 e^- szükséges, és a reakció terméke 2 H_2 molekula, s a reakció újabb $\text{SiP}_3\text{Fe-H}_2$ komplexek létrejöttéhez vezet. A hidrogéntermelés pozitív visszacsatolásként hat növelve a kiindulási anyagok koncentrációját és a reakciósebességet is.

Az 51. ábra mutatja az N_2RR és az $aHER$ folyamatok hálózatát, amelyet a mikrokinetikai modellel leírtunk. Mivel nagy feleslegben adagolt erős sav és redukálószer jelenlétét modelleztük ($[(\text{Et}_2\text{O})_2\text{H}]^+$, KC_8), kizárólag a dinitrogén- és dihidrogén-koordinációt tekintettük reverzibilis folyamatnak. Az N_2RR -ciklusban (51. ábra, bal oldal) tisztán disztális mechanizmust feltételeztünk, mert a reagensekkel a kísérletek ennek a reakciónak a uralkodó jelenlétére utalnak $[(\text{Et}_2\text{O})_2\text{H}]^+$ és KC_8 esetén.²⁷² Az N_2RR - és $aHER$ -ciklusok a SiP_3Fe intermediernél fonódnak össze (lásd a 51. ábra „Elágazás” keretét), ugyanis ez a köztitermék képes N_2 és H_2 megkötésére is, amelyet az $\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2$ és $\text{SiP}_3\text{Fe-H}_2$ komplexek kölcsönös egymásba alakíthatósága bizonyít.²⁷⁰

A feltételezett $aHER$ -ciklusban (51. ábra, jobb oldal) monohidridek ($\text{SiP}_3\text{Fe(H)}^{+/0}$), dihidridek ($\text{SiP}_3\text{Fe-H}_2^{+/0}$) és trihidridek ($\text{SiP}_3\text{Fe(H)-H}_2^{+/0}$) alakulnak egymásba protonátadások, elektronátadások, illetve hidrogénkoordinációs lépések révén. A szabad koordinációs helyekre ($\text{SiP}_3\text{Fe}^{+/0}$, illetve $\text{SiP}_3\text{Fe(H)}^{+/0}$) természetesen nemcsak H_2 , hanem N_2 is kerülhet, így minden dihidrid és trihidrid egy-egy dinitrogén komplex párral együtt jelenik meg a ciklusban. „A”, „B” és „C” fekete keretekkel jelöltük az ebből adódó variációs lehetőségeket. Különösen fontos az $\text{SiP}_3\text{Fe(H)-H}_2$ $aHER$ -intermedier és a $\text{SiP}_3\text{Fe(H)-N}_2$ stabil hidrid egymással versengő képződése („B” keret), mert ez dönti el, hogy egy adott komplexrészecske valóban végigmegy-e az $aHER$ -cikluson, vagy pedig katalizátor-deaktiválódás következik be. Az egyes kereteken belül elhelyezett komplexhármasok tagjai között reverzibilis átalakulást feltételeztünk, azaz megengedtünk dekoordinációs elemi lépéseket is, mivel a Peters-csoport eredményei reverzibilis H_2/N_2 cserékre utaltak.^{270,271}



51. ábra Az $SiP_3Fe-N_2^-$ katalizátor használatával végrehajtott biomimetikus nitrogénfixálás feltételezett elemi lépései, $[(Et_2O)_2H]^+$ protonforrással és KC_8 elektronforrással. A könnyebb áttekinthetőség érdekében az intermediereket a bal alsó sarokban bemutatott egyszerűsítéssel ábrázoltuk, ahol az SiP_3 ligandumot sárga és barna körök szimbolizálják, a komplex összetöltése pedig a vasat jelölő fekete kör belsejében látható (+: egyszeres pozitív töltés; 0: semleges töltés; -: egyszeres negatív töltés). A nyilak feletti számok a standard aktiválási szabadentalpiát mutatják kcal/mol-ban (zárójelben a kísérleti adatokat ± 3 kcal/mol-on belül legjobban reprodukáló gátak vannak feltüntetve). A H értékek a mikrokinetikai modellhez felhasznált Henry-állandók. Kismolekula-koordináció illetve -dekoordináció (fekete nyilak) esetén a „/” jel előtti szám a koordinációhoz, az utána lévő pedig a dekoordinációhoz tartozik.

A következő lépésben meghatároztuk az összes elemi reakció standard aktiválási szabadentalpiáját. Az így kapott $\Delta G^{\ddagger 0}$ értékeket a reakciónyilak fölött tüntettük fel (51. ábra). Az N_2RR -ciklus majdnem teljes egészében alacsony gátakon keresztül zajlik: az $\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2^-$ katalizátorból induló, és a semleges $\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2$ -ben végződő elemi reakció-sorban minden gát alacsonyabb 11 kcal/mol-nál, viszont a katalizátor regenerálódását lehetővé tevő redukciós lépés ($\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2 + e^- \rightarrow \text{SiP}_3\text{Fe-N}_2^-$) aktiválási szabadentalpiája kiugróan magas:* 14 kcal/mol, amely megközelíti a -78°C -on érvényes határ-gátmagasságot. Ez az elektronátadás a szilíciumtartalmú katalizátorral végzett ammóniaszintézis szűk keresztmetszete, és magyarázza az $\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2$ katalitikus elegyben megfigyelt felhalmozódását.²⁶⁹

7 kcal/mol és 10 kcal/mol a N_2 -, illetve H_2 SiP_3Fe -re történő koordinációjának gátja, vagyis az eltérés a módszerünk hibahatárán belül van. Ez arra utal, hogy az SiP_3Fe intermedierek egy része hidrogént fog megkötni nitrogén helyett, létrehozva ezzel az első *aHER*-intermediert ($\text{SiP}_3\text{Fe-H}_2$).

A dihidrogén-komplex képződésével beinduló autokatalitikus hidrogénfejlődési ciklusban számított gátak alacsonyak, összemérhetőek az N_2RR -lépések aktiválási szabadentalpiáival. Az első protonálódási lépés (egyben hidrogénleadás) aktiválási szabadentalpiája mindössze 6 kcal/mol, ami kevesebb mint fele az $\text{SiP}_3\text{Fe-H}_2$ -ből történő H_2 -dekoordináció számított gátjának ($\Delta G^{\ddagger 0} = 15$ kcal/mol); ez azt jelenti, hogy ha egyszer már beindult az *aHER* folyamata, nincs visszatérési lehetőség az N_2RR -ciklusba. A protontranszfer termékéből ($\text{SiP}_3\text{Fe(H)}^+$, lásd az 51. ábra „A” keretét) kiindulva szintén könnyedén, legfeljebb 4 kcal/mol aktiválási szabadentalpiát igénylő elemi reakciókon keresztül képződik az $\text{SiP}_3\text{Fe(H)-H}_2$ trihidrid („B” keret, fent). Ezzel a folyamattal párhuzamosan az $\text{SiP}_3\text{Fe(H)-N}_2$ deaktivált katalizátorforma („B” keret, lent) is kialakulhat, és ehhez sincs szükség jelentős aktiválási szabadentalpia befektetésére ($\Delta G^{\ddagger 0} \leq 5$ kcal/mol). Az $\text{SiP}_3\text{Fe(H)-N}_2$ semmilyen módon nem képes tovább alakulni, ugyanis a kísérletek alapján a proton- és elektronforrással szemben is inert,²⁶⁹ ezenfelül a nitrogénleválás is – az $\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2$ intermedierhez hasonlóan – kinetikailag gátolt ($\Delta G^{\ddagger 0} = 19$ kcal/mol). Az *aHER*-reakció sor ennek megfelelően csak a trihidridből kiindulva folytatódhat, amelynek az $\text{SiP}_3\text{Fe-H}_2^+$ dihidridet és a második hidrogénmolekula-leadást eredményező protonálódása a legmagasabb aktiválási szabadentalpiával ($\Delta G^{\ddagger 0} = 11$ kcal/mol) járó átalakulás a ciklusban. Ez a $\Delta G^{\ddagger 0}$ adat azonban csak az *aHER*-lépésekkel összehasonlítva kiemelkedő, az N_2RR -ciklus több lépésének is ehhez

* Szigorúan véve a DFT-eredmények kb. 4 kcal/mol-os bizonytalansága miatt nem lehetne „kiugró” értéket azonosítani pusztán a számított adatokból. A $\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2$ kísérletileg megfigyelt felhalmozódása erősíti meg, hogy az említett redukciós lépés gátja valóban szignifikánsan magasabb, mint a többi elemi lépésé.

hasonló a gátja. Összességében az N_2RR és $aHER$ reakciók számított gátjai hasonlóak, és alátámasztják azt az ötletet, hogy egymás mellett játszódnak le a reakcióegyben, ellentétben a bimolekuláris HER -re esetén számított jóval magasabb gátakkal szemben.

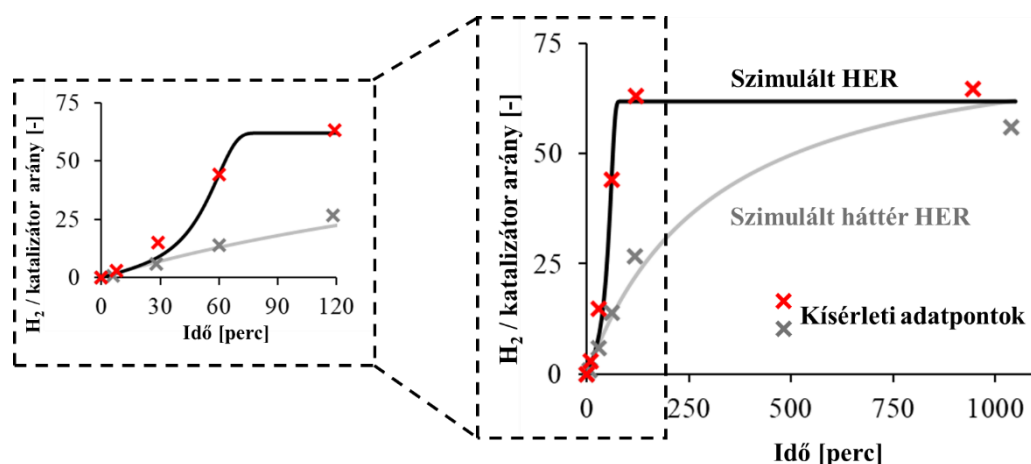
Az Eyring-Polányi egyenlet alapján az aktiválási szabadentalpiák kis hibája is nagyságrendi eltérést okoz a reakciósebességi állandóban, amely exponenciálisan függ $\Delta G^{\ddagger 0}$ -tól. Ezért mikrokinetikai modellezés során különösen fontos a modell paramétereinek illesztése kísérleti adatokhoz. Modellünket a következő kísérleti információk alapján illesztettük.

1. Egy konkrét reakcióelegyre ($0,43 \text{ mmol/dm}^3 \text{ SiP}_3\text{Fe-N}_2^-$, 63 mmol/dm^3 Brookhart sav (HBAr^{F_4}), $80 \text{ mmol/dm}^3 \text{ KC}_8$ dietil-éterben, N_2 atmoszféra alatt) ismert a gázfázis hidrogéntartalmának időbeni alakulása.²⁵⁸

2. Többféle sav- és redukálószerfelesleggel megmérték egy óra reakcióidő után az átviteli számokat.²⁵⁸

A fenti adatokat célértékként tápláltuk be a COPASI programba,²⁷³ amelyben a „Hooke & Jeeves” optimalizációs algoritmust²⁷⁴ választottuk ki az illesztési probléma megoldására. A kísérletek eredményeit a lehető legkisebb összesített eltéréssel reprodukáló, $\pm 3 \text{ kcal/mol}$ -os hibaintervallumon belül elhelyezkedő illesztett aktiválási szabadentalpiák az a DFT-vel számított gátak alatt zárójelben láthatóak (51. ábra).

A felállított modellünk validálásához szimuláltuk egy olyan kísérlet eredményét, ahol a hidrogénfejlődést követték nyomon katalizátor jelenlétében és anélkül (52. ábra). A szimulációk csaknem tökéletesen reprodukálják a piros keresztekkel jelölt, mért hidrogén-anyagmennyiségeket. A reagensek összemérésétől számított kb. 15 percen belül a szimulált hidrogénfejlődés fekete görbéje belesimul a spontán HER szürke görbéjébe, mivel itt még nem gyűlik össze annyi H_2 az oldatban, hogy beinduljon az $aHER$ -ciklus. Ezután exponenciálisan növekszik a H_2 mennyisége, mivel egyre több komplex kerül az át az $aHER$ folyamatába, és elindul az autokatalízis. Végül a reagensek elfogynak, s megállnak a reakciók.



52. ábra A H₂ fejlődésének szimulált időbeni alakulása 63 mmol/dm³ protonforrás, 80 mmol/dm³ elektronforrás jelenlétében katalizátor nélkül (szürke folytonos vonal), valamint 0,43 mmol/dm³ SiP₃Fe-N₂⁻ katalizátorral (fekete folytonos vonal), N₂ atmoszféra alatt. A H₂ anyagmennyisége a függőleges tengelyen a katalizátor anyagmennyiségéhez arányítva van feltüntetve. A piros és szürke keresztek kísérleti adatokat jelölnek [258] alapján.

Modellünket kísérletileg lehetne úgy ellenőrizni, ha dideutériumot (D₂) adagolnának a katalitikus elegyhez. Ha valóban az *aHER* révén deaktiválódik a katalizátor, akkor SiP₃Fe(H)-N₂ mellett SiP₃Fe(D)-N₂ is képződne. A deuterált vas-hidrid spektroszkópai módszerekkel (legcélyszerűbben IR vagy NMR) könnyedén megkülönböztethető lenne az SiP₃Fe(H)-N₂-től.

Ezután azt vizsgáltuk, hogy az *aHER*-aktivitás hogyan befolyásolja az átviteli számot és a szelektivitást különféle kísérleti elrendezésekben (amely egy tipikus kísérletsorozatban a reagens/katalizátor arány változtatását jelenti). Ehhez öt különböző koncentráció-beállítással futtattuk le a mikrokinetikai szimulációt: a kezdeti sav- és redukálószerkoncentrációt változatlan értéken tartottuk, míg a katalizátor kiindulási koncentrációját variáltuk úgy, hogy 10-szeres, 50-szeres, 150-szeres, 750-szeres és 1500-szoros legyen a protonfelesleg. A felsorolt arányokból hármát kísérleti cikkekből vettünk át: 50 ekvivalens (eq.) savval történő nitrogénredukciót követően határozták meg a poszt-katalitikus elegy összetételét,²⁶⁹ 150 ekvivalens savval történt a hidrogénfejlődés mennyiségi meghatározása,²⁵⁸ és 1500 ekvivalens sav hozzáadásakor mutatta az SiP₃Fe-N₂⁻ katalizátor az eddig tapasztalt legmagasabb átviteli számot.²⁵⁸ A 10- és 750-szeres feleslegeket a teljesség kedvéért, a trendek jobb beazonosíthatósága érdekében adtuk hozzá a vizsgálatainkhoz. Akkor tekintettük befejezettnek a reakcióelegyben zajló folyamatokat, amikor a protonforrás 99%-a elfogyott. Tesztszámításokkal igazoltuk, hogy ezután a pont után – releváns időskálán - már nem változik érdemben egyik komponens mennyisége sem.

A szimulációk eredményeit az 53. ábra ábrázolja. A felső sorban elhelyezett grafikonokon az egyes vaskomplex-intermedierek móltörtjének időbeni változása látható. A két, felhalmozódásra hajlamos intermediert ($\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2$ és $\text{SiP}_3\text{Fe(H)-N}_2$) kék és piros görbék jelölik, a többi vastartalmú szerkezetnek csak az összesített részaránya látható feketével. A negyedik, zöld színű görbe a még el nem reagált savmolekulák százalékos arányát mutatja.

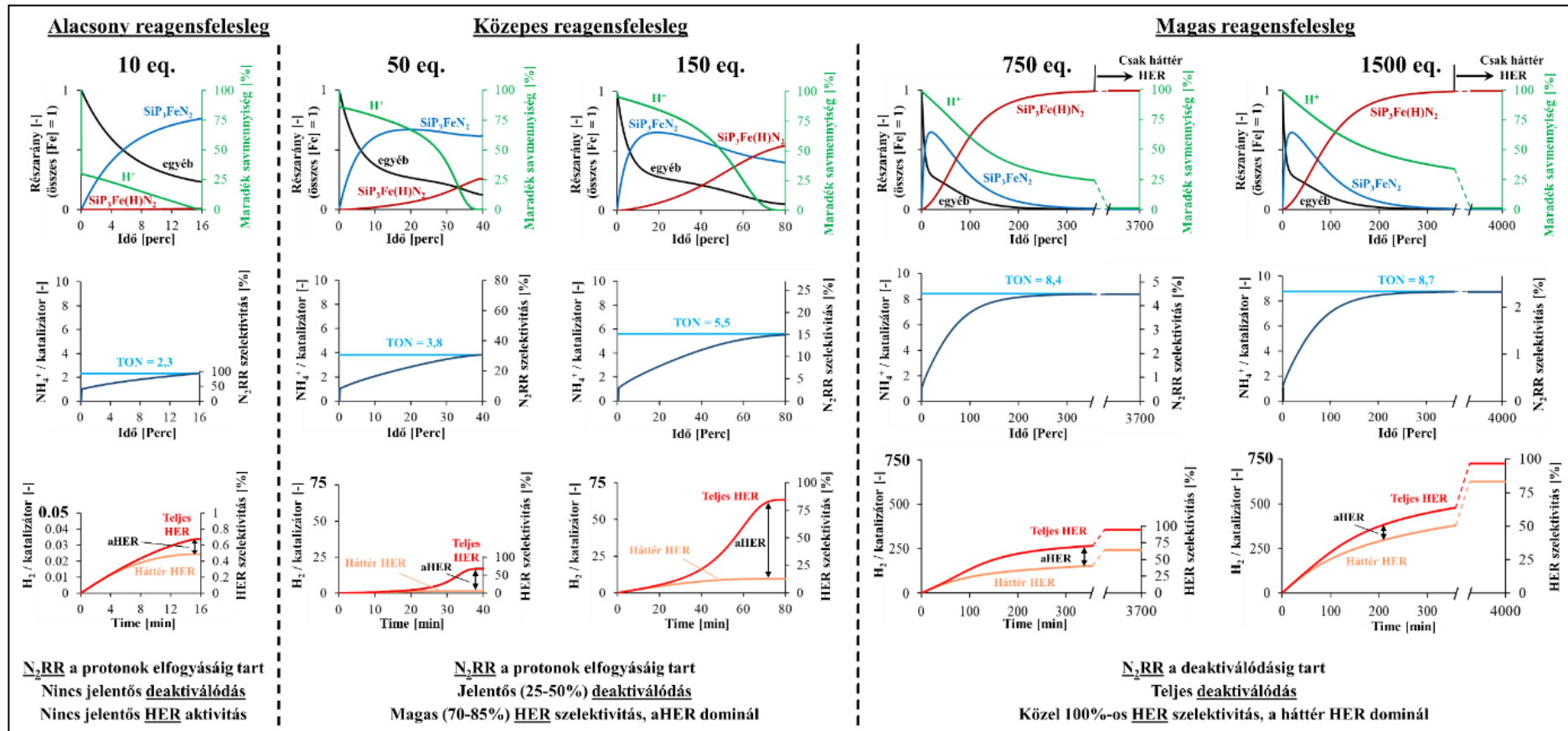
50 ekvivalens savval lefuttatva a szimulációt, a posztkatalitikus elegyben szinte kizárólag $\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2$ és $\text{SiP}_3\text{Fe(H)-N}_2$ jelenik meg a kísérleti tapasztalattal egyezően.²⁶⁹ Kismennyiségű proton- és elektronforrás jelentésében (lásd 10 eq.) az N_2RR -ciklus annyival gyorsabb a mellékreakcióknál, hogy gyakorlatilag teljesen elnyomja azt, melynek következtében elhanyagolható mennyiségű $\text{SiP}_3\text{Fe(H)-N}_2$ termelődik. Ahogy növeljük a reagensfelesleget, az inaktív katalizátorforma koncentrációja egyre nő, és már 750 ekvivalensnél teljessé válik a hidridde történő konverzió. Nagy feleslegnél tehát (750-1500 eq.) nem a reagensfogyás, hanem a deaktiválódás akasztja meg az N_2RR folyamatát.

A második grafikonsorban az egy katalizátorkompleyre eső ammóniumion-termelés (bal függőleges tengely), illetve a szelektivitás (jobb függőleges tengely) időfüggése látható. A TON alig növekszik a reagensfelesleggel. A legmagasabb szimulált TON 8,7 nagyon jó egyezést mutat a 4,6-os kísérleti adattal, különösen, ha figyelembe vesszük a reakciósebesség aktiválási gátaaktól való exponenciális függését és a kísérletek adatok bizonytalanságát is.

A TON-görbék 750-1500 ekvivalensnél megjelenő ellaposodó alakja jó jelzi a deaktiválódást: az ammóniaképződés 300 perc környékére gyakorlatilag leáll. Alacsony reagens/katalizátor arányoknál ezzel szemben a TON folyamatos növekedést mutat még a protonok 99%-ának elfogyásakor is, ami azt jelenti, hogy a reagensek újbóli adagolásakor tovább folytatódna a nitrogénredukció.

Az átviteli számból és a reagensfelesleg mértékéből számítható a biomimetikus nitrogénfixálás hatékonyságát leíró másik paraméter, a szelektivitás* mely a jobb oldali tengelyről olvasható le százalékban. A kísérleti kutatócsoport tapasztalataival összhangban az átviteli szám növelése ezen modell szerint csak a szelektivitás jelentős csökkenése árán valósítható meg.

* Azt fejezi ki, hogy a betáplált reagensek mekkora része hasznosul ammónia formájában. Ideális esetben - amennyiben kizárólag nitrogénredukció játszódik le a reakcióelegyben - a szelektivitás 100%-os, de még a természetes nitrogénfixálás folyamatában is csak 75% érhető el, hiszen 8 protonból/elektronból csak 6 épül be az ammóniába.



53. ábra A biomimetikus nitrogénfixálás reakcióelegyének időbeni változása 63 mmol/dm^3 protonforrásból, 80 mmol/dm^3 elektronforrásból, valamint (10-szeres, 50-szeres, 150-szeres, 750-szeres és 1500-szoros savfeleslegnek megfelelően) 6,3, 1,26, 0,43, 0,084, illetve $0,042 \text{ mmol/dm}^3$ $\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2^-$ katalizátorból kiindulva, mikrokinetikai szimulációk alapján. Első sor: az egyes intermedierek koncentrációinak egymáshoz viszonyított alakulása; külön szerepelnek a leginkább felhalmozódásra hajlamos intermedierek, azaz a semleges dinitrogén komplex ($\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2$) és a stabil hidrid ($\text{SiP}_3\text{Fe(H)-N}_2$). Második sor: az egy katalizátorkomplexre eső ammóniumion-termelés és az N_2RR szelektívás (az NH_4^+ -ba beépülő protonok teljes protonmennyiséghez viszonyított aránya) alakulása. Harmadik sor: az egy katalizátorkomplexre eső H_2 -termelés és a HER szelektívás (a H_2 -be beépülő protonok teljes protonmennyiséghez viszonyított aránya) alakulása, piros folytonos vonallal jelölve. A spontán (háttér) HER hozzájárulását a narancssárga vonal mutatja. Magas feleslegeknél a katalizátor deaktíválódása (99%-nyi $\text{SiP}_3\text{Fe(H)-N}_2$ forma kialakulása) és a szimuláció végpontja (99%-os protonfogyás elérése) közti időtartam rövidítve szerepel, melyet a vízszintes tengelyen „/” szimbólumok jeleznek.

Az 53. ábra harmadik sorának grafikonjai a hidrogénfejlődés (piros) időbeni alakulását ábrázolják mutatva a háttér *HER* (narancssárga görbe) és az *aHER* viszonyát, amely jelentősen változik a reagensfelesleggel. Alacsony felesleg (10 eq.) esetén, mindkét *HER*-mechanizmus visszaszorul. Az *aHER* közepes mennyiségű (50 és 150 eq.) sav és redukálószer jelenlétben dominánssá válik. Nagy feleslegek esetén (750 és 1500 eq.) a rendkívül alacsony katalizátorkoncentráció miatt a háttér *HER* a meghatározó.

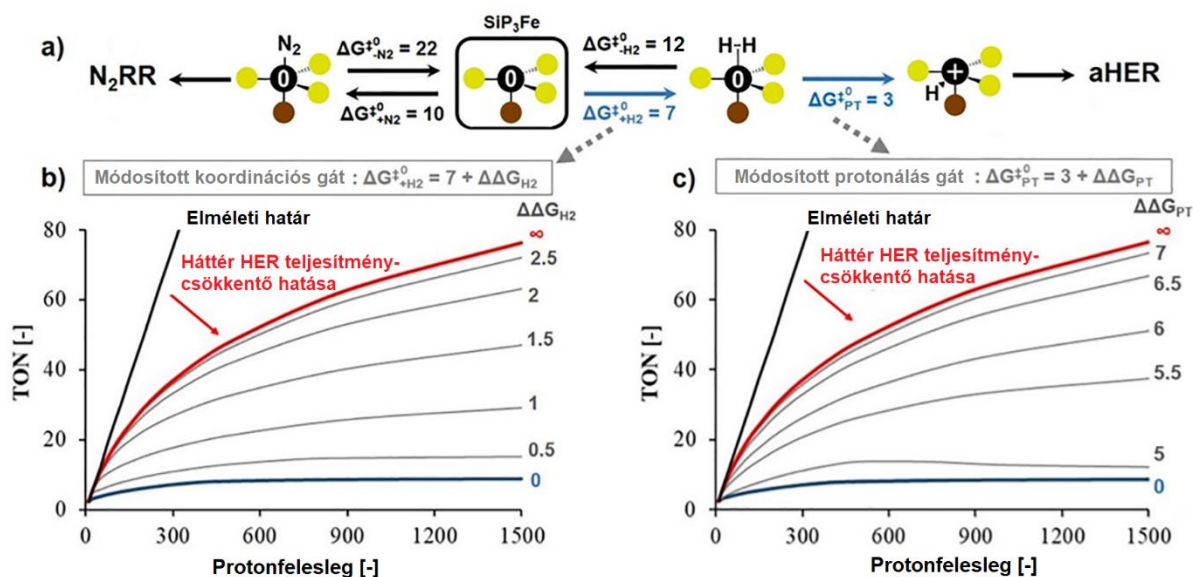
Az eddigiekből következik, hogy nem várhatunk ipari szempontból releváns átviteliszámértékeket az **EP₃Fe-N₂** típusú katalizátoroktól mindaddig, amíg az *N₂RR*-ciklussal versengő *aHER* lejátszódhat. A hatékonyság növeléséhez csökkenteni kell az autokatalitikus hidrogénfejlődés sebességét.

Az *aHER*-ciklus visszaszorításának kétféle módját vizsgáltuk: egyrészt az **SiP₃Fe** komplex H₂-höz való affinitásának csökkentését (ez pl. a ligandum fenil- vagy izopropil-csoportjainak szubsztituálásával, az elektronikus hatások finomhangolásával érhető el), másrészt az **SiP₃Fe-H₂** komplexre történő protonátadás aktiválási gátjának növelését (ez pedig célszerűen a vas körüli sztérikus zsúfoltság növelésével valósíthat meg).

A 54. ábra számos szimuláció adataiból áll össze (7-7 TON-görbét hasonlítottunk össze, és minden egyes görbét 10 szimuláció adataiból átlagolás segítségével kaptunk meg), amelyek azonban gyorsan, legfeljebb néhány perc alatt lefutnak egy átlagos PC-n is. Ugyanezeket az adatokat kísérletekből kinyerni sokkal drágább, idő- és erőforrásigényesebb lenne.

A kék görbék az eredeti **SiP₃Fe-N₂** katalizátorra kapott végső átviteli számokat mutatják, így tulajdonképpen az 53. ábra második sorában megjelenített eredményeket ábrázolják összesítve, új kontextusban. Amint a korábbiakban láttuk, a maximálisan elérhető TON a savfelesleg növelésével egyre kevésbé nő, a deaktiválódás és a *HER* folyamatok előtérbe kerülése miatt egy telítési görbe rajzolódik ki, amely nagymértékben elhajlik az elméleti TON-egyenessétől (fekete vonal, amely minden pontjában a savfelesleg negyedének felel meg).

A b) grafikonon a hidrogénaffinitás csökkenésének hatása látható. A kék görbe feletti szürke görbét oly módon nyertük, hogy az **SiP₃Fe + H₂ → SiP₃Fe-H₂** elemi reakció mikrokinetikai modellben szereplő gátját ($\Delta G^{\ddagger 0}_{+H_2} = 7$ kcal/mol; lásd 54. ábra) a görbe mellett feltüntetett $\Delta\Delta G_{H_2}$ értékkel megnöveltük, míg az ellentétes **SiP₃Fe-H₂ → SiP₃Fe + H₂** transzformáció gátját ($\Delta G^{\ddagger 0}_{-H_2} = 12$ kcal/mol) változatlanul hagytuk. Ekkor az affinitás, amely definíció szerint a kötődési szabadentalpia ellentétje, azaz aktiválási szabadentalpiákkal kifejezve $\Delta G^{\ddagger 0}_{-H_2} - \Delta G^{\ddagger 0}_{+H_2}$, ugyanezzel a $\Delta\Delta G_{H_2}$ értékkel lecsökken.



54. ábra. (a) Az N₂RR és aHER ciklusokat összekötő elemi lépések és a hozzájuk tartozó illesztett standard aktiválási szabadentalpiák. A $\Delta G^{\ddagger 0}$ mellett szereplő alsó indexek a reakciótípust jelzik. „+X₂” (X = H vagy N): X₂ koordináció a Fe centrumhoz; „-X₂” (X = H vagy N): X₂ távozása (dekoordinációja) Fe-ről; „PT”: protontranszfer. (b–c) Két kiválasztott gát ($\Delta G^{\ddagger 0}_{+H_2}$, $\Delta G^{\ddagger 0}_{PT}$) megváltoztatásának hatása a végső átviteli számokra a protonfelesleg függvényében (a 53. ábra alatt feltüntetett katalitikus körülmények között). Kék görbék: az eredeti, illesztett mikrokinetikai modell eredményei. Szürke görbék: az adott görbe mellett feltüntetett értékkel történő aktiválásigát-módosítás hatása a végső TON-ra. Piros görbék: az aHER-mechanizmus teljes visszaszorításának hatása a végső TON-ra. Fekete egyenesek: elméleti TON értékek (a sav/katalizátor arány negyede). Minden itt szereplő szabadentalpia érték kcal/mol-ban értendő.

A legalsó szürke görbe (amelyet $\Delta G_{+H_2} = 7 + 0,5 = 7,5$ kcal/mol mellett vettünk fel) alapján már 0,5 kcal/mol-nyi affinitáscsökkenés is elegendő ahhoz, hogy kétszeresére nőjenek az átviteli számok. Ennek magyarázata, hogy az SiP₃Fe-re történő dihidrogén-koordináció sebessége kb. negyedére csökken (mivel $e^{-\frac{\Delta \Delta G}{RT}} = 0,27$), ami kedvez az N₂RR-ciklusnak, az aHER-t és a deaktiválást pedig lelassítja. Ha még kedvezőtlenebb H₂-kötődést feltételezünk, a TON további növekedést mutat (lásd az 1-2,5 kcal/mol változtatással kapott szürke TON-görbék), hiszen a dihidrogén-koordináció valószínűsége egyre kisebb és kisebb lesz, ezzel fokozatosan megszűnik az aHER-aktivitás. $\Delta \Delta G_{H_2} = 2,5$ kcal/mol esetén 1500-szoros savfelesleg alkalmazásakor már 73-as átviteli számra számíthatunk, vagyis gyakorlatilag elérjük a leghatékonyabb Peters-féle nitrogenáz (BP₃Fe-N₂) teljesítményét.

A H₂-kordináció gátlása egyértelműen a TON növekedését vonja maga után, de még az *aHER*-ciklus teljes kiiktatásával (ez matematikailag $\Delta\Delta G_{H_2} = \infty$ -nek felel meg) sem kerülhetünk tetszőlegesen közel az elméleti TON-határ egyeneséhez. A $\Delta\Delta G_{H_2} = \infty$ mellett felvett piros görbe alig tér el a 7 kcal/mol-lal módosított gát ($\Delta G^{\ddagger 0}_{+H_2} = 7 + 2,5 = 9$), piros görbéjétől, amely az ammóniumion-termelés gyakorlatban elérhető felső határaként értelmezhető. Ez 0-tól kb. 100-szoros savfeleslegig az elméleti átviteliszám-korlát feketével jelölt egyenesével együtt halad, ezután azonban meredeksége gyorsan lecsökken. Ennek oka a háttér *HER* lehet, amely egy elkerülhetetlen mellékreakció és jelentős hatékonyságcsökkentő faktor egyben.

A hidrogénaffinitáshoz hasonlóan megvizsgáltuk az **SiP₃Fe-H₂** komplex protonálódási gátjának hatását is, amelyet a 54. ábra c) grafikonja mutat. A b) ábrán látottakkal ellentétben a protonaddíció aktiválási szabadentalpiáját ($\Delta G^{\ddagger 0}_{PT}$, amely a mikrokinetikai modellben 3 kcal/mol) 5 kcal/mol-nál kisebb mértékben növelve nem tapasztalunk semmilyen számottevő változást a végső TON-ban. Ez azzal magyarázható, hogy az **SiP₃Fe-H₂ + H⁺ → SiP₃Fe(H)⁺ + H₂** transzformáció még több kcal/mol-lal megemelt gát esetén is kedvezőbb kinetikailag, mint a dihidrogén dekoordinációja ($\Delta G^{\ddagger 0}_{-H_2} = 11$ kcal/mol). Amint azonban átlépjük a $\Delta\Delta G_{PT} = 5$ kcal/mol-os határt (azaz a 3 + 5 = 8 kcal/mol-os gátat), az *N₂RR*-ciklusba visszavezető dekoordináció válik dominánssá, és az átviteli szám jelentős növekedéséhez vezet. A háttér *HER* behatárolja a teljesítményt; $\Delta\Delta G_{PT} = 7$ kcal/mol-on túl már alig változik az ammóniumion-termelés és még végtelen nagy protonálási gáttal is csak kb. 80-as TON-ra számíthatunk.

Egyértelmű, hogy a $\Delta G^{\ddagger 0}_{+H_2}$ és $\Delta G^{\ddagger 0}_{PT}$ gátak alapvető hatással vannak a katalitikus hatékonyságra, ezért megvizsgáltuk, hogy a bór és szén axiális ligandummal rendelkező analógok esetén hogyan alakulnak ezek az értékek. A **CP₃Fe** és a **BP₃Fe** is igen gyorsan képes megkötni a H₂-t ($\Delta G^{\ddagger 0}_{+H_2} = 3$ kcal/mol mindkét rendszerre), azonban a dihidrogén-komplex (**EP₃Fe-H₂**) protonálása – az *N₂RR* szempontjából kedvező módon - nehézkes: $\Delta G^{\ddagger 0}_{PT} = 11$ kcal/mol (**CP₃Fe**) és 18 kcal/mol (**BP₃Fe**). A dihidrogén-protonálási gátak Si < C < B sorrendje összhangban van a kísérletileg mért TON és szelektivitás értékek Si < C < B szerinti növekedésével, ami alátámasztja az *aHER*-hipotézisünket.

A disszertáció jelen alfejezetében a két mellékreakció, azaz a katalizátor-deaktiválódás és a katalitikus hidrogénfejlődés szoros összefüggését vizsgáltam. Javaslatot tettünk az autokatalitikus hidrogénfejlődés (*aHER*) ciklusra, amelyet a savból és redukálószerből spontán fejlődő H₂ indít be, amely a szabad koordinációs hellyel rendelkező **EP₃Fe** típusú közti-termékek reakciópartnere lehet. Az így képződő **EP₃Fe-H₂** dihidrogén-komplexből két proton és két elektron felvételével két H₂ molekula fejlődhet, azaz a katalizátor elősegíti a

hidrogéngáz fejlődését. Az *aHER* folyamat egyes vas-hidrid intermedierjei emellett egy olyan mellékreakcióban is résztvehetnek, amelynek során egy N_2 molekula megkötésével egy stabil hidrid is ki tud alakulni, amely felhalmozódik a reakcióelegyben és az N_2RR -aktivitás megszűnéséhez vezet.

A mikrokinetikai szimulációkból kapott adatok alapján a biomimetikus nitrogénfixálás hatékonyságának növelése az alábbi három megközelítés (vagy ezek kombinációja) mentén lehetséges: (1) Folyamatos vagy félfolyamatos reaktort kell alkalmazni, a lehető legkisebb reagens/katalizátor arány beállításával és fenntartásával. (2) Olyan sav-redukálószer kombinációt kell választani, amelyből a lehető legkevesebb „háttérhidrogén” fejlődik (ennek alternatívájaként H_2 -megkötő komponenst kell adagolni a reakcióelegybe) (3) A jelenleg alkalmazott katalizátor-ligandum megfelelő módosításaival (pl. az izopropil- vagy fenilcsoport szubsztitúciójával) el kell érni a dihidrogén-affinitás csökkenését, vagy pedig az esetlegesen képződő dihidrogén-komplexek protonálódását.

7. Összefoglalás és kitekintés

Az átmenetifémek mindenütt jelen vannak és kulcsszerepet játszanak a katalízisben: a biológiai átalakulásokban és az ipari eljárásokban is. A számításon alapuló kémiai módszerek atomi szinten nyújtanak betekintést a katalizátorok működését irányító molekuláris mechanizmusokba, és segítenek a reaktivitást meghatározó faktorok azonosításában.

A számítási módszerek és az erőforrások rohamos fejlődése egyre nagyobb rendszerek egyre pontosabb vizsgálatát teszi lehetővé. A kvantumkémiai számítások, molekuladinamikai szimulációk, QM/MM módszerek jelentősen hozzá tudnak járulni a (bio)katalizátorok működésének megértéséhez, és az eredményeket felhasználhatjuk hatékonyabb katalizátorok, és egyéb molekuláris anyagok, pl. spinváltó vegyületek tervezéséhez is, amelyeket idővel pl. nanokapcsolóként vagy nanotranzisztorként használhatunk[S21]. Bioinformatikai módszerek segítségével ugrásszerűen nő az új azonosított enzimek száma, amelyek akár ipari alkalmazásra is alkalmasak lehetnek, pl. szénhidrogének célzott átalakítására, gyógyszerek célzott szintézisére. Modellezésével azonosíthatjuk a kulcsfontosságú aminosavakat és javaslatot tehetünk célzott mutánsok előállítására, amelyek számunkra fontos reakciót képesek katalizálni.

Doktori értekezésemben átmenetifém-tartalmú enzimek és biomimetikus nitrogénfixálásra alkalmas katalizátorok reaktivitását vizsgáltam. Több irányból közelítettem meg a gyógyszeripari kutatásokban is jelentős szerepet játszó citokróm P450 enzimek reaktivitását. Megmutattuk, hogy az egyes CYP izoformák aktív formájának a reaktivitása nagyon hasonló, így metabolitprediktálás során gyakorlatilag azonosnak tekinthető. A dextrometorfán metabolizmusának modellezése elvezetett arra a következtetésre, hogy nem mindig érvényes a közelség/reaktivitás paradigma és a predikcióképesség növeléséhez célszerű lenne a metabolikus út átmeneti állapotainak szerkezetét figyelembe venni a dokkolást alkalmazó módszerek esetén. Az ösztrogén hormonok magas szintje a szervezetben jelentősen megnöveli a hormonfüggő rákok kialakulásának kockázatát. Ennek kapcsán vizsgáltuk az aromatáz enzimet, amely jelentősen befolyásolja az emberben mérhető hormonszintet, valamint a Premarin hormonpótló készítmény jelentősebb összetevőinek a metabolizmusát. Az emberben csak hormonpótló terápia kapcsán előforduló equilin és equilenin metabolizmusa könnyebben vezet káros 4-hidroxilált metabolitokhoz, mint az emberben is termelődő ösztrogen, amelynek oka a C₄-es szénatom növekvő nukleofilicitása az ösztrogen<equilin<equilenin sorrendben.

A hemcsoport nemcsak oxigén, de egyéb kétatomos gázmolekulák megkötésére is alkalmas. Noha ebből fakad a nitrogén-monoxid és szén-monoxid mérgező hatása, mégis

kulcsszerepet játszik a jelátvitelben az élőlényekben. Megmutattuk, hogy a DFT módszerek jelentősen (kb 10 kcal/mol-lal) alábecsülik a NO kötési energiáját mind Fe(II)- mind Fe(III)-tartalmú hemcsoportokhoz. Kidolgoztunk egy módszert, amellyel gázok és hemtartalmú fehérjék közti reakció mechanizmusa vizsgálható a gázok diffúziójának és a kémiai kötés kialakulásának figyelembevételével. A módszert a mioglobinon validáltuk, majd H-NOX fehérjék gáztároló képességének vizsgálata során alkalmaztuk.

Az izopropil-malát dehidrogenáz enzim által katalizált reakció mechanizmusát kísérletekkel és számításokkal is vizsgáltuk, azonosítottuk a katalízisben szerepet játszó legfontosabb aminosavakat, és azt, hogyan fejtik ki katalitikus hatásukat.

Meghatároztuk az $EP_3Fe-N_2^-$ típusú nitrogénfixálásra alkalmas katalizátorok katalitikus ciklusának termodinamikai profilját, amely két fő lépésből áll: a redukciós szakaszból és a regenerációs szakaszból. Az utóbbiban megszűnik a nitrogénredukció termodinamikai hajtóereje, és az itt keletkező intermedierek lehetnek a katalizátorok deaktivációjának és a hidrogénfejlődési mellékreakciók kiinduló pontjai. Eredményeink alapján az elegyben képződő H_2 katalizátorméregként viselkedik, amely beindítja a deaktiválódáshoz vezető autokatalitikus hidrogénfejlődési (*aHER*) ciklust. Végül javaslatot tettünk a katalizátorok lehetséges fejlesztésére.

Komplex rendszerek esetében figyelembe kell vennünk, hogy a reakcióban sok közttermék és többféle termék képződhet, a köztük lévő átalakulások bonyolultak lehetnek, ráadásul az egyes komponensek koncentrációja jelentősen befolyásolja a bejárt reakcióutakat. Ilyenkor nem mindig elegendő a reakcióhők és aktiválási gátak ismerete, a lejátszódó folyamatok megértéséhez, azonban a mikrokinetikai modellezés segíthet megérteni őket. Hasonló megközelítést már alkalmaznak a rendszerbiológiai tanulmányoknál pl. sejtszintű szabályozó és jelző útvonalak működésének megértéséhez.^{275,276}

A kvantumkémia fejlettsége elért arra szintre, hogy hatékonyan hozzá tudjon járulni akár biológiailag releváns rendszerek modellezéséhez is, pl. az ösztrogének karcinogén hatásának megértéséhez. Az irodalomban számos útvonalat felvetettek, köztük olyanokat is, amelyek kvantumkémiai módszerekkel vizsgálhatók (pl. az ösztrogének bioaktivációja során képződő katekolok és kinonok reakcióútjai). Élőszervezetekben gyakran nehéz lehet meghatározni, hogy melyik útvonal jelentős és melyik nem, de reményeink szerint mikrokinetikai modellezés segítségével azonosíthatóak lesznek a legfontosabb mutációkhoz vezető útvonalak.

Hosszú még az út ahhoz, hogy rutinszerűen vizsgálhassunk ilyen rendszereket, de a magasszintű számítások kombinálása rohamtempóban fejlődő egyéb módszerekkel (pl. gépi tanulás, fragmensalapú módszerek) szintén új perspektívát nyithat.

8. Dolgozat témájához kapcsolódó PhD értekezések

Krámos Balázs: "Enzimkatalízis számítógépes modellezése P450 enzimekben" PhD 2015

Krezingner Anikó "Kölcsönhatások fehérjerendszerekben" PhD 2018

Benedek Zsolt: „A biomimetikus nitrogénfixálás reakcióhálózatának felderítése elméleti kémiai módszerekkel” PhD benyújtás éve: 2021 (fokozatszerzés folyamatban)

9. Dolgozat alapjául szolgáló közlemények

(D1) Lonsdale, R.; Oláh, J.; Mulholland, A. J. A. J.; Harvey, J. N. J. N. J. N. Does Compound i Vary Significantly between Isoforms of Cytochrome P450? *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (39), 15464–15474. <https://doi.org/10.1021/ja203157u>.

(D2) Oláh, J.; Mulholland, A. J.; Harvey, J. N. Understanding the Determinants of Selectivity in Drug Metabolism through Modeling of Dextromethorphan Oxidation by Cytochrome P450. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (15), 6050–6055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010194108>.

(D3) Lábás, A.; Krámos, B.; Oláh, J. Combined Docking and Quantum Chemical Study on CYP-Mediated Metabolism of Estrogens in Man. *Chem. Res. Toxicol.* **2017**, *30* (2), 583–594. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00330>.

(D4) Krámos, B.; Oláh, J. Enolization as an Alternative Proton Delivery Pathway in Human Aromatase (P450 19A1). *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (2), 390–405. <https://doi.org/10.1021/jp407365x>.

(D5) Krámos, B.; Oláh, J. The Mechanism of Human Aromatase (CYP 19A1) Revisited: DFT and QM/MM Calculations Support a Compound I-Mediated Pathway for the Aromatization Process. *Struct. Chem.* **2015**, *26* (1), 279–300. <https://doi.org/10.1007/s11224-014-0545-9>.

(D6) Oláh, J.; Harvey, J. N. NO Bonding to Heme Groups: DFT and Correlated Ab Initio Calculations. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113* (26), 7338–7345. <https://doi.org/10.1021/jp811316n>.

(D7) Krámos, B.; Menyhárd, D. K.; Oláh, J. Direct Hydride Shift Mechanism and Stereoselectivity of P450 nor Confirmed by QM/MM Calculations. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (2), 872–885. <https://doi.org/10.1021/jp2080918>.

(D8) Lábás, A.; Menyhárd, D. K.; Harvey, J. N.; Oláh, J. First Principles Calculation of the Reaction Rates for Ligand Binding to Myoglobin: The Cases of NO and CO. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24* (20), 5350–5358. <https://doi.org/10.1002/chem.201704867>.

(D9) Rozza, A. M.; Menyhárd, D. K.; Oláh, J. Gas Sensing by Bacterial H-NOX Proteins: An MD Study. *Molecules* **2020**, *25* (12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules25122882>.

(D10) Palló, A.; Oláh, J.; Gráczer, É.; Merli, A.; Závodszy, P.; Weiss, M. S.; Vas, M. Structural and Energetic Basis of Isopropylmalate Dehydrogenase Enzyme Catalysis. *FEBS J.* **2014**, *281* (22), 5063–5076. <https://doi.org/10.1111/febs.13044>.

(D11) Gráczer, É.; Palló, A.; Oláh, J.; Szimler, T.; Konarev, P. V.; Svergun, D. I.;

Merli, A.; Závodszy, P.; Weiss, M. S.; Vas, M. Glutamate 270 Plays an Essential Role in K⁺-Activation and Domain Closure of *THER*mus *THER*mophilus Isopropylmalate Dehydrogenase. *FEBS Lett.* **2015**, *589* (2), 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.12.005>.

(D12) Gráczér, É.; Szimler, T.; Garamszegi, A.; Konarev, P. V.; Lábás, A.; Oláh, J.; Palló, A.; Svergun, D. I.; Merli, A.; Závodszy, P.; Weiss, M. S.; Vas, M. Dual Role of the Active Site Residues of *THER*mus *THER*mophilus 3-Isopropylmalate Dehydrogenase: Chemical Catalysis and Domain Closure. *Biochemistry* **2016**, *55* (3), 560–574. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00839>.

(D13) Benedek, Z.; Papp, M.; Oláh, J.; Szilvási, T. Identifying the Rate-Limiting Elementary Steps of Nitrogen Fixation with Single-Site Fe Model Complexes. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (14), 8499–8508. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01183>.

(D14) Benedek, Z.; Papp, M.; Oláh, J.; Szilvási, T. Exploring Hydrogen Evolution Accompanying Nitrogen Reduction on Biomimetic Nitrogenase Analogs: Can Fe–N x H y Intermediates Be Active Under Turnover Conditions? *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (12), 7969–7977. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b00719>.

(D15) Benedek, Z.; Papp, M.; Oláh, J.; Szilvási, T. Demonstrating the Direct Relationship between Hydrogen Evolution Reaction and Catalyst Deactivation in Synthetic Fe Nitrogenases. *ACS Catal.* **2020**, *10* (21), 12555–12568. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c02315>.

10. PhD fokozat megszerzése után megjelent közlemények, amelyek nem képezik a dolgozat tárgyát

(S1) Oláh, J.; Veszprémi, T.; De Proft, F.; Geerlings, P. Silylenes: A Unified Picture of Their Stability, Acid–Base and Spin Properties, Nucleophilicity, and Electrophilicity via Computational and Conceptual Density Functional Theory. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111* (42), 10815–10823. <https://doi.org/10.1021/jp067742k>.

(S2) Oláh, J.; Veszprémi, T. Mechanism of Water Addition to Silatriafulvenes and Silapentafulvenes. *Organometallics* **2008**, *27* (12), 2723–2729. <https://doi.org/10.1021/om7011826>.

(S3) Tóth, F.; Oláh, J.; Kalas, G.; Greiner, I.; Szöllősy, Á.; Gömőry, Á.; Hazai, L.; Szántay, C. Synthesis of Vinca Alkaloids and Related Compounds. Part 110: A New Synthetic Method for the Preparation of Pandoline-Type Alkaloid-like Molecules. *Tetrahedron* **2008**, *64* (34), 7949–7955. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.06.015>.

(S4) Correa, J. V.; Jaque, P.; Oláh, J.; Toro-Labbé, A.; Geerlings, P. Nucleophilicity and Electrophilicity of Silylenes from a Molecular Electrostatic Potential and Dual Descriptor Perspectives. *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *470* (4–6), 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2009.01.054>.

(S5) Oláh, J.; Veszprémi, T.; Woollins, J. D.; Blockhuys, F. Combining the Chemistries of Silylene and Sulfur-Nitrogen Compounds—SiS₂N₂ and Related Systems. *Dalt. Trans.* **2010**, *39* (13), 3256–3263. <https://doi.org/10.1039/b923084j>.

(S6) Duerr, K.; Olah, J.; Davydov, R.; Kleimann, M.; Li, J.; Lang, N.; Puchta, R.; Hübner, E.; Drewello, T.; Harvey, J. N.; Jux, N.; Ivanović-Burmazović, I. Studies on an

Iron(III)Peroxo Porphyrin. Iron(III)-Peroxo or Iron(I)-Superoxo? *Dalt. Trans.* **2010**, *39* (8), 20492056. <https://doi.org/10.1039/b920237d>.

(S7) Duerr, K.; Troepfner, O.; Olah, J.; Li, J.; Zahl, A.; Drewello, T.; Jux, N.; Harvey, J. N.; Ivanović-Burmazović, I. Solution Behavior of Iron(III) and Iron(II) Porphyrins in DMSO and Reaction with Superoxide. Effect of Neighboring Positive Charge on *THER*modynamics, Kinetics and Nature of Iron-(Su)Peroxo Product. *Dalt. Trans.* **2012**, *41* (2), 546–557. <https://doi.org/10.1039/C1DT11521A>.

(S8) Kelemen, Z.; Hollóczki, O.; Oláh, J.; Nyulászi, L. Oxazol-2-Ylidenes. A New Class of Stable Carbenes? *RSC Adv.* **2013**, *3* (21), 7970-7978. <https://doi.org/10.1039/c3ra41177j>.

(S9) Bakó, I.; Bencsura, Á.; *HER*mannson, K.; Bálint, S.; Grósz, T.; Chihaiia, V.; Oláh, J. Hydrogen Bond Network Topology in Liquid Water and Methanol: A Graph Theory Approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (36), 15163-15171. <https://doi.org/10.1039/c3cp52271g>.

(S10) Náray-Szabó, G.; Oláh, J.; Krámos, B. Quantum Mechanical Modeling: A Tool for the Understanding of Enzyme Reactions. *Biomolecules* **2013**, *3* (4), 662–702. <https://doi.org/10.3390/biom3030662>.

(S11) Nagy, G. N.; Marton, L.; Krámos, B.; Oláh, J.; Révész, Á.; Vékey, K.; Delsuc, F.; Hunyadi-Gulyás, É.; Medzihradzky, K. F.; Lavigne, M.; Vial, H.; Cerdan, R.; Vértessy, B. G. Evolutionary and Mechanistic Insights into Substrate and Product Accommodation of CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase from *Plasmodium Falciparum*. *FEBS J.* **2013**, *280* (13), 3132–3148. <https://doi.org/10.1111/febs.12282>.

(S12) Marton, L.; Nagy, G. N.; Ozohanics, O.; Lábás, A.; Krámos, B.; Oláh, J.; Vékey, K.; Vértessy, B. G. Molecular Mechanism for the *THER*mo-Sensitive Phenotype of CHO-MT58 Cell Line Harboring a Mutant CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase. *PLoS One* **2015**, *10* (6), e0129632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129632>.

(S13) Lábás, A.; Krámos, B.; Bakó, I.; Oláh, J. Accurate Modeling of Cation– π Interactions in Enzymes: A Case Study on the CDPCho:Phosphocholine Cytidylyltransferase Complex. *Struct. Chem.* **2015**, *26* (5–6), 1411–1423. <https://doi.org/10.1007/s11224-015-0658-9>.

(S14) Vanpoucke, D. E. P.; Oláh, J.; De Proft, F.; Van Speybroeck, V.; Roos, G. Convergence of Atomic Charges with the Size of the Enzymatic Environment. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (3), 564–571. <https://doi.org/10.1021/ci5006417>.

(S15) Oláh, J.; van Bergen, L.; De Proft, F.; Roos, G. How Does the Protein Environment Optimize the *THER*modynamics of Thiol Sulfenylation? Insights from Model Systems to QM/MM Calculations on Human 2-Cys Peroxiredoxin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2015**, *33* (3), 584–596. <https://doi.org/10.1080/07391102.2014.907543>.

(S16) Szabó, T.; Dargó, G.; Szentjóni, H.; Tóth, T.; Krámos, B.; Izrael, R.; Oláh, J.; Németh, T.; Balogh, G. T.; Huszthy, P. Synthesis, Experimental and Theoretical Studies on the Factors Influencing the PKa Values of New Crown *EtHER*s Containing a Diarylphosphinic Acid Unit. *Tetrahedron* **2016**, *72* (52), 8593–8602. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.11.041>.

(S17) Bakó, I.; Lábás, A.; *HER*mannson, K.; Bencsura, Á.; Oláh, J. How Can We Detect Hydrogen Bond Local Cooperativity in Liquid Water: A Simulation Study. *J. Mol. Liq.* **2017**, *245*, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.08.023>.

(S18) Lábás, A.; Bakó, I.; Oláh, J. Hydration SpHERE Structure of Proteins: A Theoretical Study. *J. Mol. Liq.* **2017**, *238*, 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.038>.

(S19) Bakó, I.; Oláh, J.; Lábás, A.; Bálint, S.; Pusztai, L.; Bellissent Funel, M. C. Water-Formamide Mixtures: Topology of the Hydrogen-Bonded Network. *J. Mol. Liq.* **2017**, *228*, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.10.052>.

(S20) Kiss, D. J.; Oláh, J.; Tóth, G.; Menyhárd, D. K.; Ferenczy, G. G. Quantum Chemical Calculations Support Pseudouridine Synthase Reaction through a Glycol Intermediate and Provide Details of the Mechanism. *Theor. Chem. Acc.* **2018**, *137* (12), 162. <https://doi.org/10.1007/s00214-018-2361-6>.

(S21) Xue, S.; Guo, Y.; Rotaru, A.; Müller-Bunz, H.; Morgan, G. G.; Trzop, E.; Collet, E.; Oláh, J.; Garcia, Y. Spin Crossover Behavior in a Homologous Series of Iron(II) Complexes Based on Functionalized Bipyridyl Ligands. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (16), 9880–9891. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b00850>.

(S22) Roos, G.; Oláh, J.; Ingle, R.; Kobayashi, R.; Feldt, M. Online Conferences – Towards a New (Virtual) Reality. *Comput. Theor. Chem.* **2020**, *1189* (May), 112975. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2020.112975>.

(S23) Meelua, W.; Keawkla, N.; Oláh, J.; Jitonnorn, J. DFT Study of Formation and Properties of Dinuclear Zirconocene Cations: Effects of Ligand Structure, Solvent, and Metal on the Dimerization Process. *J. Organomet. Chem.* **2020**, *905*, 121024. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2019.121024>.

(S24) Meelua, W.; Wanjai, T.; Thinkumrob, N.; Oláh, J.; Mujika, J. I.; Ketudat-Cairns, J. R.; Hannongbua, S.; Jitonnorn, J. Active Site Dynamics and Catalytic Mechanism in Arabinan Hydrolysis Catalyzed by GH43 Endo-Arabinanase from QM/MM Molecular Dynamics Simulation and Potential Energy Surface. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2021**, *0* (0), 1–11. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1898469>.

11. PhD fokozat megszerzése előtt megjelent közlemények

(PhD1) Csonka, G. I.; Ruzsinszky, A.; Oláh, J.; Alsenoy, C. Van. Organizing Atomic Partial Charges into a Database. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2002**, *589–590*, 1–5.

[https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(02\)00297-X](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(02)00297-X).

(PhD2) Oláh, J.; Van Alsenoy, C.; Sannigrahi, A. B. Condensed Fukui Functions Derived from Stockholder Charges: Assessment of Their Performance as Local Reactivity Descriptors. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106* (15), 3885–3890. <https://doi.org/10.1021/jp014039h>.

(PhD3) Oláh, J.; Veszprémi, T. Relationship between Stability and Dimerization Ability of Silylenes. *J. Organomet. Chem.* **2003**, *686* (1–2), 112–117. [https://doi.org/10.1016/S0022328X\(03\)00534-5](https://doi.org/10.1016/S0022328X(03)00534-5).

(PhD4) Oláh, J.; Veszprémi, T. Molecular Structure and Internal Rotation Potential of Perfluoro (2,4-Dimethyl-3-Oxa-2,4-Diazapentane), (CF₃)₂N–O–N(CF₃)₂. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2003**, *620* (2–3), 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(02\)00595X](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(02)00595X).

(PhD5) Oláh, J.; Alsenoy, C. Van; Veszprémi, T. NaSCN: Striking Differences between Its GasPhase and Crystal-Phase Structure: A Theoretical Study. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108* (40), 8400–8406. <https://doi.org/10.1021/jp0478662>.

(PhD6) Oláh, J.; De Proft, F.; Veszprémi, T.; Geerlings, P. Spin-Philicity and Spin-Donicity of Substituted Carbenes, Silylenes, Germynes, and Stannylenes. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108* (3), 490–499. <https://doi.org/10.1021/jp0363390>.

(PhD7) Tersago, K.; Oláh, J.; Martin, J. M. L.; Veszprémi, T.; Van Alsenoy, C.; Blockhuys, F. Is *THERE* a Satisfactory Description of the Molecular Structure of Roesky's Ketone? *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *413* (4–6), 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2005.08.017>.

(PhD8) Medebach, M.; Jordán, R. C.; Reiber, H.; Schöpe, H.-J.; Biehl, R.; Evers, M.; Hessinger, D.; Olah, J.; Palberg, T.; Schönberger, E.; Wette, P. Drude-Type Conductivity of Charged *SpHERE* Colloidal Crystals: Density and Temperature Dependence. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123* (10), 104903. <https://doi.org/10.1063/1.1997134>.

(PhD9) Oláh, J.; Proft, F. De; Veszprémi, T.; Geerlings, P. Hard–Soft Acid–Base Interactions of Silylenes and Germynes. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109* (8), 1608–1615.

<https://doi.org/10.1021/jp0468556>.

(PhD10) Oláh, J.; Veszprémi, T.; Nguyen, M. T. Spin-Philicity and Spin-Donicity of Simple Nitrenes and Phosphinidenes. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *401* (4–6), 337–341.

<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2004.11.066>.

(PhD11) Oláh, J.; Blockhuys, F.; Veszprémi, T.; Van Alsenoy, C. On the Usefulness of Bond Orders and Overlap Populations to Chalcogen-Nitrogen Systems. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *2006* (1), 69–77. <https://doi.org/10.1002/ejic.200500489>.

(PhD12) Oláh, J.; Proft, F. De; Veszprémi, T.; Geerlings, P. Relationship between Electrophilicity and Spin-Philicity of Divalent and Monovalent Species of Group 14 and 15 Elements. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2006**, *771* (1–3), 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2006.03.020>.

12. Irodalomjegyzék

- (1) *Transition Metals in Coordination Environments*; Broclawik, E., Borowski, T., Radoń, M., Eds.; Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics; Springer International Publishing: Cham, 2019; Vol. 29. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-11714-6>.
- (2) Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. General Performance of Density Functionals. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111* (42), 10439–10452. <https://doi.org/10.1021/jp0734474>.
- (3) Simões, J. A. M.; Beauchamp, J. L. Transition Metal–Hydrogen and Metal–Carbon Bond Strengths: The Keys to Catalysis. *Chem. Rev.* **1990**, *90* (4), 629–688. <https://doi.org/10.1021/cr00102a004>.
- (4) Harvey, J. N. The Coupled-Cluster Description of Electronic Structure: Perspectives for Bioinorganic Chemistry. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16* (6), 831–839. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0786-7>.
- (5) Weymuth, T.; Couzijn, E. P. A.; Chen, P.; Reiher, M. New Benchmark Set of Transition-Metal Coordination Reactions for the Assessment of Density Functionals. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10* (8), 3092–3103. <https://doi.org/10.1021/ct500248h>.
- (6) Aoto, Y. A.; De Lima Batista, A. P.; Köhn, A.; De Oliveira-Filho, A. G. S. How to Arrive at Accurate Benchmark Values for Transition Metal Compounds: Computation or Experiment? *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13* (11), 5291–5316. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00688>.
- (7) Vancoillie, S.; Zhao, H.; Radoń, M.; Pierloot, K. Performance of CASPT2 and DFT for Relative Spin-State Energetics of Heme Models. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6* (2), 576–582. <https://doi.org/10.1021/ct900567c>.
- (8) Radón, M.; Broclawik, E.; Pierloot, K. Electronic Structure of Selected {FeNO}7 Complexes in Heme and Non-Heme Architectures: A Density Functional and Multireference Ab Initio Study. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (3), 1518–1528. <https://doi.org/10.1021/jp910220r>.
- (9) Radoń, M.; Gassowska, K.; Szklarzewicz, J.; Broclawik, E. Spin-State Energetics of Fe(III) and Ru(III) Aqua Complexes: Accurate Ab Initio Calculations and Evidence for Huge Solvation Effects. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12* (4), 1592–1605. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b01234>.
- (10) Radoń, M.; Broclawik, E.; Pierloot, K. DFT and Ab Initio Study of Iron-Oxo Porphyrins: May They Have a Low-Lying Iron(V)-Oxo Electromer? *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7* (4), 898–908. <https://doi.org/10.1021/ct1006168>.
- (11) Vlček, A.; Zális, S. Modeling of Charge-Transfer Transitions and Excited States in D6 Transition Metal Complexes by DFT Techniques. *Coordination Chemistry Reviews*. Elsevier February 1, 2007, pp 258–287. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.05.021>.
- (12) Wang, Y.; Ren, Q. DFT Study of the Mechanisms of Transition-Metal-Catalyzed Reductive Coupling Reactions. *Curr. Org. Chem.* **2020**, *24* (12), 1367–1383. <https://doi.org/10.2174/1385272824999200608135840>.
- (13) Schleder, G. R.; Padilha, A. C. M.; Acosta, C. M.; Costa, M.; Fazzio, A. From DFT to Machine Learning: Recent Approaches to Materials Science - A Review. *JPhys Mater.* **2019**, *2* (3), 32001. <https://doi.org/10.1088/2515-7639/ab084b>.
- (14) Harvey, J. N. On the Accuracy of Density Functional Theory in Transition Metal Chemistry. *Annu. Reports Sect. "C" (Physical Chem.* **2006**, *102*, 203. <https://doi.org/10.1039/b419105f>.
- (15) Furche, F.; Perdew, J. P. The Performance of Semilocal and Hybrid Density Functionals

- in 3d Transition-Metal Chemistry. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124* (4), 044103. <https://doi.org/10.1063/1.2162161>.
- (16) Smith, D. M. A.; Dupuis, M.; Straatsma, T. P. Multiplet Splittings and Other Properties from Density Functional Theory: An Assessment in Iron-Porphyrin Systems. *Mol. Phys.* **2005**, *103* (2–3), 273–278. <https://doi.org/10.1080/00268970512331317309>.
- (17) Harvey, J. N. DFT Computation of Relative Spin-State Energetics of Transition Metal Compounds. In *Structure and Bonding*; Kaltsoyannis, N., McGrady, J. E., Ed.; Springer-Verlag, 2004; pp 151–184. <https://doi.org/10.1007/b97939>.
- (18) Droghetti, A.; Alfè, D.; Sanvito, S. Assessment of Density Functional Theory for Iron(II) Molecules across the Spin-Crossover Transition. *J. Chem. Phys.* **2012**, *137* (12), 124303. <https://doi.org/10.1063/1.4752411>.
- (19) Siegbahn, P. E. M.; Blomberg, M. R. A.; Chen, S. Significant van Der Waals Effects in Transition Metal. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6* (7), 2040–2044. <https://doi.org/10.1021/ct100213e>.
- (20) Grimme, S.; Steinmetz, M. Effects of London Dispersion Correction in Density Functional Theory on the Structures of Organic Molecules in the Gas Phase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (38), 16031. <https://doi.org/10.1039/c3cp52293h>.
- (21) Grimme, S.; Ehrlich, S.; Goerigk, L. Effect of the Damping Function in Dispersion Corrected Density Functional Theory. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32* (7), 1456–1465. <https://doi.org/10.1002/jcc.21759>.
- (22) Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H. A Consistent and Accurate Ab Initio Parametrization of Density Functional Dispersion Correction (DFT-D) for the 94 Elements H-Pu. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132* (15), 154104. <https://doi.org/10.1063/1.3382344>.
- (23) Lennard-Jones, J. E. Proceedings of the Physical Society. *Nature* **1957**, *180* (4587), 635–635. <https://doi.org/10.1038/180635b0>.
- (24) Chai, J.-D.; Head-Gordon, M. Long-Range Corrected Hybrid Density Functionals with Damped Atom–Atom Dispersion Corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10* (44), 6615. <https://doi.org/10.1039/b810189b>.
- (25) Autschbach, J. Perspective: Relativistic Effects. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136* (15), 150902. <https://doi.org/10.1063/1.3702628>.
- (26) Nakajima, Y.; Seino, J.; Nakai, H. Relativistic Effect on Enthalpy of Formation for Transition-Metal Complexes. *Chem. Phys. Lett.* **2017**, *673*, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.01.072>.
- (27) Reiher, M. Douglas-Kroll-Hess Theory: A Relativistic Electrons-Only Theory for Chemistry. *Theor. Chem. Acc.* **2006**, *116* (1–3), 241–252. <https://doi.org/10.1007/s00214-005-0003-2>.
- (28) Harvey, J. N. Spin-Forbidden Reactions: Computational Insight into Mechanisms and Kinetics. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2014**, *4* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1002/wcms.1154>.
- (29) Harvey, J. N. Understanding the Kinetics of Spin-Forbidden Chemical Reactions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9* (3), 331–343. <https://doi.org/10.1039/b614390c>.
- (30) Harvey, J. N.; Aschi, M. Modelling Spin-Forbidden Reactions: Recombination of Carbon Monoxide with Iron Tetracarbonyl. *Faraday Discuss.* **2003**, *124* (0), 129. <https://doi.org/10.1039/b211871h>.
- (31) Neese, F.; Petrenko, T.; Ganyushin, D.; Olbrich, G. Advanced Aspects of Ab Initio Theoretical Optical Spectroscopy of Transition Metal Complexes: Multiplets, Spin-Orbit Coupling and Resonance Raman Intensities. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251* (3–4), 288–327. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.05.019>.
- (32) Neese, F. Prediction of Molecular Properties and Molecular Spectroscopy with Density

- Functional Theory: From Fundamental Theory to Exchange-Coupling. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253* (5–6), 526–563. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.014>.
- (33) deVisser, S. P.; Shaik, S.; Sharma, P. K.; Kumar, D.; Thiel, W. Active Species of Horseradish Peroxidase (HRP) and Cytochrome P450: Two Electronic Chameleons. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (51), 15779–15788. <https://doi.org/10.1021/ja0380906>.
- (34) de Visser, S. P.; Ogliaro, F.; Sharma, P. K.; Shaik, S. What Factors Affect the Regioselectivity of Oxidation by Cytochrome P450? A DFT Study of Allylic Hydroxylation and Double Bond Epoxidation in a Model Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (39), 11809–11826. <https://doi.org/10.1021/ja026872d>.
- (35) Cao, L.; Ryde, U. Influence of the Protein and DFT Method on the Broken-Symmetry and Spin States in Nitrogenase. *Int. J. Quantum Chem.* **2018**, *118* (15), e25627. <https://doi.org/10.1002/qua.25627>.
- (36) Maurer, D.; Enugala, T. R.; Hamnevik, E.; Bauer, P.; Lüking, M.; Petrović, D.; Hillier, H.; Kamerlin, S. C. L.; Dobritsch, D.; Widersten, M. Stereo- and Regioselectivity in Catalyzed Transformation of a 1,2-Disubstituted Vicinal Diol and the Corresponding Diketone by Wild Type and Laboratory Evolved Alcohol Dehydrogenases. *ACS Catal.* **2018**, *8* (8), 7526–7538. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b01762>.
- (37) Warshel, A.; Weiss, R. M. An Empirical Valence Bond Approach for Comparing Reactions in Solutions and in Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (20), 6218–6226. <https://doi.org/10.1021/ja00540a008>.
- (38) Amrein, B. A.; Bauer, P.; Duarte, F.; Janfalk Carlsson, Å.; Naworyta, A.; Mowbray, S. L.; Widersten, M.; Kamerlin, S. C. L. Expanding the Catalytic Triad in Epoxide Hydrolases and Related Enzymes. *ACS Catal.* **2015**, *5* (10), 5702–5713. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b01639>.
- (39) Sheng, X.; Kazemi, M.; Planas, F.; Himo, F. Modeling Enzymatic Enantioselectivity Using Quantum Chemical Methodology. *ACS Catal.* **2020**, *10* (11), 6430–6449. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c00983>.
- (40) Himo, F. Recent Trends in Quantum Chemical Modeling of Enzymatic Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (20), 6780–6786. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b02671>.
- (41) Blomberg, M. R. A.; Borowski, T.; Himo, F.; Liao, R. Z.; Siegbahn, P. E. M. Quantum Chemical Studies of Mechanisms for Metalloenzymes. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (7), 3601–3658. <https://doi.org/10.1021/cr400388t>.
- (42) Han, S. B.; Ali, H. S.; de Visser, S. P. Glutarate Hydroxylation by the Carbon Starvation-Induced Protein D: A Computational Study into the Stereo- and Regioselectivities of the Reaction. *Inorg. Chem.* **2021**, *60* (7), 4800–4815. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c03749>.
- (43) Quesne, M. G.; de Visser, S. P. The Quest for Accurate Theoretical Models of Metalloenzymes: An Aid to Experiment. In *Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics*; Springer, 2019; Vol. 29, pp 439–462. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11714-6_14.
- (44) Field, M. J.; Bash, P. A.; Karplus, M. A Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Potential for Molecular Dynamics Simulations. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11* (6), 700–733. <https://doi.org/10.1002/jcc.540110605>.
- (45) Warshel, A.; Levitt, M. Theoretical Studies of Enzymic Reactions: Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of the Carbonium Ion in the Reaction of Lysozyme. *J. Mol. Biol.* **1976**, *103* (2), 227–249. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90311-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90311-9).
- (46) Quesne, M. G.; Borowski, T.; De Visser, S. P. Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Modeling of Enzymatic Processes: Caveats and Breakthroughs. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (8), 2562–2581. <https://doi.org/10.1002/chem.201503802>.
- (47) Lonsdale, R.; Harvey, J. N.; Mulholland, A. J. A Practical Guide to Modelling Enzyme-

- Catalysed Reactions. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (8), 3025. <https://doi.org/10.1039/c2cs15297e>.
- (48) Hirao, H. Applications of Computational Chemistry to Selected Problems of Transition-Metal Catalysis in Biological and Nonbiological Systems. In *Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics*; Springer, 2019; Vol. 29, pp 463–486. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11714-6_15.
- (49) Claeysens, F.; Harvey, J. N.; Manby, F. R.; Mata, R. A.; Mulholland, A. J.; Ranaghan, K. E.; Schütz, M.; Thiel, S.; Thiel, W.; Werner, H. J. High-Accuracy Computation of Reaction Barriers in Enzymes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, *45* (41), 6856–6859. <https://doi.org/10.1002/anie.200602711>.
- (50) Søndergaard, C. R.; Olsson, M. H. M.; Rostkowski, M.; Jensen, J. H. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of p K a Values. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7* (7), 2284–2295. <https://doi.org/10.1021/ct200133y>.
- (51) Olsson, M. H. M.; Søndergaard, C. R.; Rostkowski, M.; Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical p K a Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7* (2), 525–537. <https://doi.org/10.1021/ct100578z>.
- (52) Myers, J.; Grothaus, G.; Narayanan, S.; Onufriev, A. A Simple Clustering Algorithm Can Be Accurate Enough for Use in Calculations of PKs in Macromolecules. *Proteins* **2006**, *63* (4), 928–938. <https://doi.org/10.1002/prot.20922>.
- (53) Anandakrishnan, R.; Aguilar, B.; Onufriev, A. V. H++ 3.0: Automating PK Prediction and the Preparation of Biomolecular Structures for Atomistic Molecular Modeling and Simulations. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (W1), W537–W541. <https://doi.org/10.1093/nar/gks375>.
- (54) Gordon, J. C.; Myers, J. B.; Folta, T.; Shoja, V.; Heath, L. S.; Onufriev, A. H++: A Server for Estimating PKas and Adding Missing Hydrogens to Macromolecules. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (Web Server), W368–W371. <https://doi.org/10.1093/nar/gki464>.
- (55) H++ web server <http://biophysics.cs.vt.edu/H++> (accessed May 12, 2021).
- (56) Azizian, H.; Bahrami, H.; Pasalar, P.; Amanlou, M. Molecular Modeling of Helicobacter Pylori Arginase and the Inhibitor Coordination Interactions. *J. Mol. Graph. Model.* **2010**, *28* (7), 626–635. <https://doi.org/10.1016/j.jm gm.2009.12.007>.
- (57) MacKerell, A. D.; Banavali, N.; Foloppe, N. Development and Current Status of the CHARMM Force Field for Nucleic Acids. *Biopolymers* **2000**, *56* (4), 257–265. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)56:4<257::AID-BIP10029>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)56:4<257::AID-BIP10029>3.0.CO;2-W).
- (58) Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell, A. D. CHARMM General Force Field: A Force Field for Drug-like Molecules Compatible with the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Fields. *J. Comput. Chem.* **2009**, *31* (4), NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>.
- (59) Austin, R. H.; Beeson, K. W.; Eisenstein, L.; Frauenfelder, H.; Gunsalus, I. C. Dynamics of Ligand Binding to Myoglobin. *Biochemistry* **1975**, *14* (24), 5355–5373. <https://doi.org/10.1021/bi00695a021>.
- (60) Frauenfelder, H.; Fenimore, P. .; McMahon, B. . Hydration, Slaving and Protein Function. *Biophys. Chem.* **2002**, *98* (1–2), 35–48. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00083-2).
- (61) Im, W.; Lee, M. S.; Brooks, C. L. Generalized Born Model with a Simple Smoothing Function. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24* (14), 1691–1702. <https://doi.org/10.1002/jcc.10321>.
- (62) Abascal, J. L. F.; Vega, C. A General Purpose Model for the Condensed Phases of Water: TIP4P/2005. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123* (23), 234505. <https://doi.org/10.1063/1.2121687>.

- (63) Horn, H. W.; Swope, W. C.; Pitera, J. W.; Madura, J. D.; Dick, T. J.; Hura, G. L.; Head-Gordon, T. Development of an Improved Four-Site Water Model for Biomolecular Simulations: TIP4P-Ew. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120* (20), 9665–9678. <https://doi.org/10.1063/1.1683075>.
- (64) Izadi, S.; Anandkrishnan, R.; Onufriev, A. V. Building Water Models: A Different Approach. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5* (21), 3863–3871. <https://doi.org/10.1021/jz501780a>.
- (65) MacKerell, A. D.; Banavali, N.; Foloppe, N. Development and Current Status of the CHARMM Force Field for Nucleic Acids. *Biopolymers* **2000**, *56* (4), 257–265. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)56:4<257::AID-BIP10029>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)56:4<257::AID-BIP10029>3.0.CO;2-W).
- (66) Maseras, F.; Morokuma, K. IMOMM: A New Integrated Ab Initio + Molecular Mechanics Geometry Optimization Scheme of Equilibrium Structures and Transition States. *J. Comput. Chem.* **1995**, *16* (9), 1170–1179. <https://doi.org/10.1002/jcc.540160911>.
- (67) Humbel, S.; Sieber, S.; Morokuma, K. The IMOMO Method: Integration of Different Levels of Molecular Orbital Approximations for Geometry Optimization of Large Systems: Test for N-butane Conformation and SN2 Reaction: RCl+Cl⁻. *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 1959–1967. <https://doi.org/10.1063/1.472065>.
- (68) Svensson, M.; Humbel, S.; Morokuma, K. Energetics Using the Single Point IMOMO (Integrated Molecular Orbital+molecular Orbital) Calculations: Choices of Computational Levels and Model System. *J. Chem. Phys.* **1996**, *105* (9), 3654–3661. <https://doi.org/10.1063/1.472235>.
- (69) Svensson, M.; Humbel, S.; Froese, R. D. J.; Matsubara, T.; Sieber, S.; Morokuma, K. ONIOM: A Multilayered Integrated MO + MM Method for Geometry Optimizations and Single Point Energy Predictions. A Test for Diels-Alder Reactions and Pt(P(t-Bu)₃)₂ + H₂ Oxidative Addition. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (50), 19357–19363. <https://doi.org/10.1021/jp962071j>.
- (70) Bakowies, D.; Thiel, W. Hybrid Models for Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Approaches. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (25), 10580–10594. <https://doi.org/10.1021/JP9536514>.
- (71) Sherwood, P.; de Vries, A. H.; Guest, M. F.; Schreckenbach, G.; Catlow, C. R. A.; French, S. A.; Sokol, A. A.; Bromley, S. T.; Thiel, W.; Turner, A. J.; Billeter, S.; Terstegen, F.; Thiel, S.; Kendrick, J.; Rogers, S. C.; Casci, J.; Watson, M.; King, F.; Karlsen, E.; Sjøvoll, M.; Fahmi, A.; Schäfer, A.; Lennartz, C. QUASI: A General Purpose Implementation of the QM/MM Approach and Its Application to Problems in Catalysis. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2003**, *632* (1), 1–28. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(03\)00285-9](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(03)00285-9).
- (72) Gaus, M.; Cui, Q.; Elstner, M. DFTB3: Extension of the Self-Consistent-Charge Density-Functional Tight-Binding Method (SCC-DFTB). *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7* (4), 931–948. <https://doi.org/10.1021/ct100684s>.
- (73) Ka, J.; Thiel, S.; Senn, H. M.; Sherwood, P.; Kästner, J.; Thiel, S.; Senn, H. M.; Sherwood, P.; Thiel, W. Exploiting QM / MM Capabilities in Geometry Optimization: A Microiterative Approach Using Electrostatic Embedding. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3* (3), 1064–1072. <https://doi.org/10.1021/ct600346p>.
- (74) Lu, Y.; Farrow, M. R.; Fayon, P.; Logsdail, A. J.; Sokol, A. A.; Catlow, C. R. A.; Sherwood, P.; Keal, T. W. Open-Source, Python-Based Redevelopment of the ChemShell Multiscale QM/MM Environment. *J. Chem. Theory Comput.* **2019**, *15* (2), 1317–1328. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b01036>.
- (75) Harvey, J. N. Spin-Forbidden CO Ligand Recombination in Myoglobin. *Faraday Discuss.* **2004**, *127*, 165–177. <https://doi.org/10.1039/b314768a>.

- (76) Neese, F. An Ab Initio, DFT and Semiempirical SCF MO Package. **2012**, No. September, 533.
- (77) Neese, F. Software Update: The ORCA Program System, Version 4.0. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2018**, 8 (1), 1327. <https://doi.org/10.1002/wcms.1327>.
- (78) Tinker - software tools for molecular design.
- (79) Georgieva, P.; Himo, F. Quantum Chemical Modeling of Enzymatic Reactions: The Case of Histone Lysine Methyltransferase. *J. Comput. Chem.* **2010**, 32, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21458>.
- (80) Barducci, A.; Bonomi, M.; Parrinello, M. Metadynamics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. John Wiley & Sons September 1, 2011, pp 826–843. <https://doi.org/10.1002/wcms.31>.
- (81) Besora, M.; Vidossich, P.; Lledós, A.; Ujaque, G.; Maseras, F. Calculation of Reaction Free Energies in Solution: A Comparison of Current Approaches. *J. Phys. Chem. A* **2018**, 122 (5), 1392–1399. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b11580>.
- (82) Roux, B. The Calculation of the Potential of Mean Force Using Computer Simulations. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, 91 (1–3), 275–282. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00053-I](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00053-I).
- (83) Mihalovits, L. M.; Ferenczy, G. G.; Keserű, G. M. Catalytic Mechanism and Covalent Inhibition of UDP- N -Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA): Implications to the Design of Novel Antibacterials. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, 59 (12), 5161–5173. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00691>.
- (84) Mihalovits, L. M.; Ferenczy, G. G.; Keserű, G. M. Affinity and Selectivity Assessment of Covalent Inhibitors by Free Energy Calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, 60 (12), 6579–6594. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00834>.
- (85) Shaik, S.; Kumar, D.; de Visser, S. P.; Altun, A.; Thiel, W. *Theoretical Perspective on the Structure and Mechanism of Cytochrome P450 Enzymes.*; 2005; Vol. 105. <https://doi.org/10.1021/cr030722j>.
- (86) Shaik, S.; Cohen, S.; Wang, Y.; Chen, H.; Kumar, D.; Thiel, W. *P450 Enzymes: Their Structure, Reactivity, and Selectivity-Modeled by QM/MM Calculations.*; 2010; Vol. 110. <https://doi.org/10.1021/cr900121s>.
- (87) Isin, E. M.; Guengerich, F. P. Complex Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1770 (3), 314–329. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.07.003>.
- (88) Bernhardt, R. Cytochromes P450 as Versatile Biocatalysts. *J. Biotechnol.* **2006**, 124 (1), 128–145. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.01.026>.
- (89) Guengerich, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, 21 (1), 70–83. <https://doi.org/10.1021/tx700079z>.
- (90) Carreau, S.; Wolczynski, S.; Galeraud-Denis, I. Aromatase, Oestrogens and Human Male Reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society May 27, 2010, pp 1571–1579. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0113>.
- (91) Di Nardo, G.; Gilardi, G. Human Aromatase: Perspectives in Biochemistry and Biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd February 1, 2013, pp 92–101. <https://doi.org/10.1002/bab.1088>.
- (92) Reetz, M. T. Directed Evolution of Artificial Metalloenzymes: A Universal Means to Tune the Selectivity of Transition Metal Catalysts? *Acc. Chem. Res.* **2019**. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00582>.
- (93) Renata, H.; Wang, Z. J.; Arnold, F. H. Expanding the Enzyme Universe: Accessing Non-Natural Reactions by Mechanism-Guided Directed Evolution. *Angewandte Chemie - International Edition*. Wiley-VCH Verlag March 9, 2015, pp 3351–3367.

- <https://doi.org/10.1002/anie.201409470>.
- (94) Li, Z.; Jiang, Y.; Guengerich, F. P.; Ma, L.; Li, S.; Zhang, W. Engineering Cytochrome P450 Enzyme Systems for Biomedical and Biotechnological Applications. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295* (3), 833–849. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)49939-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)49939-x).
- (95) Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S. Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (9), 3947–3980. <https://doi.org/10.1021/cr020443g>.
- (96) Shaik, S.; Cohen, S.; Wang, Y.; Chen, H.; Kumar, D.; Thiel, W. P450 Enzymes : Their Structure , Reactivity , and Selectivity s Modeled by QM / MM Calculations. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (2), 949–1017.
- (97) *Cytochrome P450*, 4th ed.; Ortiz de Montellano, P. R., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-12108-6>.
- (98) Pelkonen, O.; Turpeinen, M.; Uusitalo, J.; Rautio, A.; Raunio, H. Prediction of Drug Metabolism and Interactions on the Basis of in Vitro Investigations. In *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*; John Wiley & Sons, Ltd, 2005; Vol. 96, pp 167–175. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto960305.x>.
- (99) Tarcsay, Á.; Keserű, G. M. In Silico Site of Metabolism Prediction of Cytochrome P450-Mediated Biotransformations. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2011**, *7* (3), 299–312. <https://doi.org/10.1517/17425255.2011.553599>.
- (100) Cruciani, G.; Carosati, E.; De Boeck, B.; Ethirajulu, K.; Mackie, C.; Howe, T.; Vianello, R. MetaSite: Understanding Metabolism in Human Cytochromes from the Perspective of the Chemist. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (22), 6970–6979. <https://doi.org/10.1021/jm050529c>.
- (101) Jones, H.; Chen, Y.; Gibson, C.; Heimbach, T.; Parrott, N.; Peters, S.; Snoeys, J.; Upreti, V.; Zheng, M.; Hall, S. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Drug Discovery and Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2015**, *97* (3), 247–262. <https://doi.org/10.1002/cpt.37>.
- (102) Lohmann, W.; Karst, U. Biomimetic Modeling of Oxidative Drug Metabolism. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391* (1), 79–96. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1794-x>.
- (103) Redlich, G.; Zanger, U. M.; Riedmaier, S.; Bache, N.; Giessing, A. B. M.; Eisenacher, M.; Stephan, C.; Meyer, H. E.; Jensen, O. N.; Marcus, K. Distinction between Human Cytochrome P450 (CYP) Isoforms and Identification of New Phosphorylation Sites by Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (11), 4678–4688. <https://doi.org/10.1021/pr800231w>.
- (104) Zheng, J.; Altun, A.; Thiel, W. Common System Setup for the Entire Catalytic Cycle of Cytochrome P450 Cam in Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Studies. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28* (13), 2147–2158. <https://doi.org/10.1002/jcc.20701>.
- (105) Altun, A.; Thiel, W. Combined Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Study on the Pentacoordinated Ferric and Ferrous Cytochrome P450cam Complexes. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (3), 1268–1280. <https://doi.org/10.1021/jp0459108>.
- (106) Balcells, D.; Raynaud, C.; Crabtree, R. H.; Eisenstein, O. The Rebound Mechanism in Catalytic C-H Oxidation by MnO(Tpp)Cl from DFT Studies: Electronic Nature of the Active Species. *Chem. Commun.* **2008**, No. 6, 744–746. <https://doi.org/10.1039/b715939k>.
- (107) Hansch, C.; Zhang, L. Quantitative Structure-Activity Relationships of Cytochrome P-450. *Drug Metab. Rev.* **1993**, *25* (1–2), 1–48. <https://doi.org/10.3109/03602539308993972>.
- (108) Roy, K.; Roy, P. P. QSAR of Cytochrome Inhibitors. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. Taylor & Francis October 2009, pp 1245–1266. <https://doi.org/10.1517/17425250903158940>.

- (109) Locuson, C. W.; Wahlstrom, J. L. Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis of Cytochromes P450: Effect of Incorporating Higher-Affinity Ligands and Potential New Applications. *Drug Metabolism and Disposition*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics July 1, 2005, pp 873–878. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.004325>.
- (110) De Groot, M. J.; Ekins, S. Pharmacophore Modeling of Cytochromes P450. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54* (3), 367–383. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00009-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00009-1).
- (111) Hritz, J.; de Ruiter, A.; Oostenbrink, C. Impact of Plasticity and Flexibility on Docking Results for Cytochrome P450 2D6: A Combined Approach of Molecular Dynamics and Ligand Docking. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (23), 7469–7477. <https://doi.org/10.1021/jm801005m>.
- (112) Testa, B.; Balmat, A. L.; Long, A.; Judson, P. Predicting Drug Metabolism - An Evaluation of the Expert System METEOR. *Chem. Biodivers.* **2005**, *2* (7), 872–885. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200590064>.
- (113) Djoumbou-Feunang, Y.; Fiamoncini, J.; Gil-de-la-Fuente, A.; Greiner, R.; Manach, C.; Wishart, D. S. BioTransformer: A Comprehensive Computational Tool for Small Molecule Metabolism Prediction and Metabolite Identification. *J. Cheminform.* **2019**, *11* (1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/s13321-018-0324-5>.
- (114) Li, J.; Schneebeli, S. T.; Bylund, J.; Farid, R.; Friesner, R. A. IDSite: An Accurate Approach to Predict P450-Mediated Drug Metabolism. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7* (11), 3829–3845. <https://doi.org/10.1021/ct200462q>.
- (115) Pirmohamed, M.; James, S.; Meakin, S.; Green, C.; Scott, A. K.; Walley, T. J.; Farrar, K.; Park, B. K.; Breckenridge, A. M. Adverse Drug Reactions as Cause of Admission to Hospital: Prospective Analysis of 18 820 Patients. *Br. Med. J.* **2004**, *329* (7456), 15–19. <https://doi.org/10.1136/bmj.329.7456.15>.
- (116) Lauschke, V. M.; Ingelman-Sundberg, M. The Importance of Patient-Specific Factors for Hepatic Drug Response and Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG October 12, 2016, p 1714. <https://doi.org/10.3390/ijms17101714>.
- (117) Lauschke, V. M.; Ingelman-Sundberg, M. Prediction of Drug Response and Adverse Drug Reactions: From Twin Studies to Next Generation Sequencing. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *130*, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.01.024>.
- (118) Petrović, J.; Pešić, V.; Lauschke, V. M. Frequencies of Clinically Important CYP2C19 and CYP2D6 Alleles Are Graded across Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* **2020**, *28* (1), 88–94. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0480-8>.
- (119) Ogliaro, F.; Harris, N.; Cohen, S.; Filatov, M.; De Visser, S. P.; Shaik, S. A Model “rebound” Mechanism of Hydroxylation by Cytochrome P450: Stepwise and Effectively Concerted Pathways, and Their Reactivity Patterns. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (37), 8977–8989. <https://doi.org/10.1021/ja991878x>.
- (120) Lewis, D. F. V; Modi, S.; Dickins, M. Structure-Activity Relationship for Human Cytochrome P450 Substrates and Inhibitors. *Drug Metab. Rev.* **2002**, *34* (1–2), 69–82. <https://doi.org/10.1081/DMR-120001391>.
- (121) Chen, W. Y. Exogenous and Endogenous Hormones and Breast Cancer. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *22*, 573–585. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2008.08.001>.
- (122) Thompson, J. A.; Malkinson, A. M.; Wand, M. D.; Mastovich, S. L.; Mead, E. W.; Schullek, K. M.; Laudenschlager, W. G. Oxidative Metabolism of Butylated Hydroxytoluene by Hepatic and Pulmonary Microsomes from Rats and Mice. *Drug Metab. Dispos.* **1987**, *15* (6), 833–840.
- (123) Pike, M. C.; Krailo, M. D.; Henderson, B. E.; Casagrande, J. T.; Hoel, D. G. ‘Hormonal’ Risk Factors, ‘Breast Tissue Age’ and the Age-Incidence of Breast Cancer. *Nature* **1983**,

- 303 (5920), 767–770. <https://doi.org/10.1038/303767a0>.
- (124) Henderson, B. E.; Ross, R.; Bernstein, L. Estrogens as a Cause of Human Cancer : The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture Estrogens as a Cause of Human Cancer : The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture1. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 246–253.
- (125) Beral, V.; Collaborators, M. W. S. Breast Cancer and Hormone-Replacement Therapy in the Million Women Study. *Lancet* **2003**, *362* (9382), 419–427. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14065-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14065-2).
- (126) Li, J. J.; Li, S. A.; Li, J. J.; Oberley, T. D.; Parsons, J. A. Carcinogenic Activities of Various Steroidal and Nonsteroidal Estrogens in the Hamster Kidney: Relation to Hormonal Activity and Cell Proliferation. *Cancer Res.* **1995**, *55* (19), 4347–4351.
- (127) Henderson, B. E.; Feigelson, H. S. Hormonal Carcinogenesis. *Carcinogenesis* **2000**, *21* (3), 427–433. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.427>.
- (128) Revankar, C. M.; Cimino, D. F.; Sklar, L. A.; Arterburn, J. B.; Prossnitz, E. R. A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science (80-.)*. **2005**, *307* (5715), 1625–1630. <https://doi.org/10.1126/science.1106943>.
- (129) Song, R. X. D.; Fan, P.; Yue, W.; Chen, Y.; Santen, R. J. Role of Receptor Complexes in the Extranuclear Actions of Estrogen Receptor α in Breast Cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **2006**, *13* (Supplement_1), S3–S13. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01322>.
- (130) Rogan, E. G.; Badawi, A. F.; Devanesan, P. D.; Meza, J. L.; Edney, J. A.; West, W. W.; Higginbotham, S. M.; Cavalieri, E. L. Relative Imbalances in Estrogen Metabolism and Conjugation in Breast Tissue of Women with Carcinoma: Potential Biomarkers of Susceptibility to Cancer. *Carcinogenesis* **2003**, *24* (4), 697–702. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg004>.
- (131) Castagnetta, L. A. M.; Granata, O. M.; Traina, A.; Ravazzolo, B.; Amoroso, M.; Miele, M.; Bellavia, V.; Agostara, B.; Carruba, G. Tissue Content of Hydroxyestrogens in Relation to Survival of Breast Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8* (10), 3146–3155. <https://doi.org/10.1210/er.21.1.40>.
- (132) Chandrasena, R. E. P.; Edirisinghe, P. D.; Bolton, J. L.; Thatcher, G. R. J. Problematic Detoxification of Estrogen Quinones by NAD(P)H-Dependent Quinone Oxidoreductase and Glutathione-S-Transferase. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21* (7), 1324–1329. <https://doi.org/10.1021/tx8000797>.
- (133) Wang, Z.; Chandrasena, E. R.; Yuan, Y.; Peng, K.; van Breemen, R. B.; Thatcher, G. R. J.; Bolton, J. L. Redox Cycling of Catechol Estrogens Generating Apurinic/Apyrimidinic Sites and 8-Oxo-Deoxyguanosine via Reactive Oxygen Species Differentiates Equine and Human Estrogens. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23* (8), 1365–1373. <https://doi.org/10.1021/tx1001282>.
- (134) Bolton, J. L.; Thatcher, G. R. J. Potential Mechanisms of Estrogen Quinone Carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21* (1), 93–101. <https://doi.org/10.1021/tx700191p>.
- (135) Huang, Z.; Guengerich, F. P.; Kaminsky, L. S. 16 α -Hydroxylation of Estrone by Human Cytochrome P4503A4/5. *Carcinogenesis* **1998**, *19* (5), 867–872.
- (136) Tsuchiya, Y.; Nakajima, M.; Yokoi, T. Cytochrome P450-Mediated Metabolism of Estrogens and Its Regulation in Human. *Cancer Lett.* **2005**, *227* (2), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.10.007>.
- (137) Itoh, T.; Takemura, H.; Shimoi, K.; Yamamoto, K. A 3D Model of CYP1B1 Explains the Dominant 4-Hydroxylation of Estradiol. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50* (6), 1173–1178. <https://doi.org/10.1021/ci1000554>.
- (138) Olsen, L.; Rydberg, P.; Rod, T. H.; Ryde, U. Prediction of Activation Energies for Hydrogen Abstraction by Cytochrome P450. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (22), 6489–6499.

- <https://doi.org/10.1021/jm060551l>.
- (139) Rydberg, P.; Ryde, U.; Olsen, L. Prediction of Activation Energies for Aromatic Oxidation by Cytochrome P450. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (50), 13058–13065. <https://doi.org/10.1021/jp803854v>.
- (140) Zhu, B. T.; Lee, A. J. NADPH-Dependent Metabolism of 17 β -Estradiol and Estrone to Polar and Nonpolar Metabolites by Human Tissues and Cytochrome P450 Isoforms. *Steroids* **2005**, *70* (4), 225–244. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.01.002>.
- (141) Parl, F. F.; Dawling, S.; Roodi, N.; Crooke, P. S. Estrogen Metabolism and Breast Cancer: A Risk Model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1155* (1), 68–75. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03676.x>.
- (142) Purdy, R. H.; Moore, P. H.; Williams, M. C.; Goldzieher, J. W.; Paul, S. M. Relative Rates of 2- and 4-Hydroxyestrogen Synthesis Are Dependent on Both Substrate and Tissue. *FEBS Lett.* **1982**, *138* (1), 40–44. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)80390-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80390-6).
- (143) Mount, D. *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor: NY, 2004.
- (144) Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Soding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G. Fast, Scalable Generation of High-Quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **2014**, *7* (1), 539–539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- (145) McWilliam, H.; Li, W.; Uludag, M.; Squizzato, S.; Park, Y. M.; Buso, N.; Cowley, A. P.; Lopez, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (W1), W597–W600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt376>.
- (146) Li, W.; Cowley, A.; Uludag, M.; Gur, T.; McWilliam, H.; Squizzato, S.; Park, Y. M.; Buso, N.; Lopez, R. The EMBL-EBI Bioinformatics Web and Programmatic Tools Framework. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (W1), W580–W584. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv279>.
- (147) Yu, J.; Zhou, Y.; Tanaka, I.; Yao, M. Roll: A New Algorithm for the Detection of Protein Pockets and Cavities with a Rolling Probe Sphere. *Bioinformatics* **2010**, *26* (1), 46–52. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp599>.
- (148) Robert, X.; Gouet, P. Deciphering Key Features in Protein Structures with the New ENDscript Server. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (W1), 320–324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>.
- (149) P. Geerlings; F. De Proft, and; Langenaeker, W. Conceptual Density Functional Theory. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (5), 1793–1874. <https://doi.org/10.1021/CR990029P>.
- (150) Groves, J. T.; McClusky, G. A. Aliphatic Hydroxylation via Oxygen Rebound. Oxygen Transfer Catalyzed by Iron. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98* (3), 859–861. <https://doi.org/10.1021/ja00419a049>.
- (151) Mak, P. J.; Luthra, A.; Sligar, S. G.; Kincaid, J. R. Resonance Raman Spectroscopy of the Oxygenated Intermediates of Human CYP19A1 Implicates a Compound i Intermediate in the Final Lyase Step. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (13), 4825–4828. <https://doi.org/10.1021/ja500054c>.
- (152) Brodie, H. J.; Kripalani, K. J.; Possanza, G. Studies on the Mechanism of Estrogen Biosynthesis. VI. The Stereochemistry of Hydrogen Elimination at C-2 during Aromatization. *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society 1969, pp 1241–1242. <https://doi.org/10.1021/ja01033a050>.
- (153) Fishman, J.; Guzik, H.; Dixon, D. Stereochemistry of Estrogen Biosynthesis. *Biochemistry* **1969**, *8* (11), 4304–4309. <https://doi.org/10.1021/bi00839a013>.
- (154) Gantt, S. L.; Denisov, I. G.; Grinkova, Y. V.; Sligar, S. G. The Critical Iron-Oxygen Intermediate in Human Aromatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *387* (1),

- 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.154>.
- (155) Wang, D.; Zheng, J.; Shaik, S.; Thiel, W. Quantum and Molecular Mechanical Study of the First Proton Transfer in the Catalytic Cycle of Cytochrome P450cam and Its Mutant D251N. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (16), 5126–5138. <https://doi.org/10.1021/jp074958t>.
- (156) Kajimura, M.; Nakanishi, T.; Takenouchi, T.; Morikawa, T.; Hishiki, T.; Yukutake, Y.; Suematsu, M. Gas Biology: Tiny Molecules Controlling Metabolic Systems. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2012**, *184* (2), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.03.016>.
- (157) Zhao, Y.; Vanhoutte, P. M.; Leung, S. W. S. Vascular Nitric Oxide: Beyond ENOS. *J. Pharmacol. Sci.* **2015**, *129* (2), 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>.
- (158) Wu, L.; Wang, R. Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57* (4), 585–630. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.3.585>.
- (159) Vanhoutte, P. M.; Zhao, Y.; Xu, A.; Leung, S. W. S. Thirty Years of Saying NO. *Circ. Res.* **2016**, *119* (2), 375–396. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306531>.
- (160) Wong, A.; Hu, N.; Tian, X.; Yang, Y.; Gehring, C. Nitric Oxide Sensing Revisited. *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd April 16, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.03.009>.
- (161) Siegbahn, P. E.; Blomberg, M. R. Transition-Metal Systems in Biochemistry Studied by High-Accuracy Quantum Chemical Methods. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (2), 421–438.
- (162) Spiro, T. G.; Zgierski, M. Z.; Kozłowski, P. M. Stereoelectronic Factors in CO, NO and O₂ Binding to Heme from Vibrational Spectroscopy and DFT Analysis. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *221*, 923–936.
- (163) Shimizu, T.; Huang, D.; Yan, F.; Stranova, M.; Bartosova, M.; Fojtíková, V.; Martínková, M. Gaseous O₂, NO, and CO in Signal Transduction: Structure and Function Relationships of Heme-Based Gas Sensors and Heme-Redox Sensors. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (13), 6491–6533. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00018>.
- (164) Mustafa, A. K.; Gadalla, M. M.; Snyder, S. H. Signaling by Gasotransmitters. *Sci. Signal.* **2009**, *2* (68), re2–re2. <https://doi.org/10.1126/scisignal.268re2>.
- (165) Sierra, H.; Cordova, M.; Chen, C.-S. J.; Rajadhyaksha, M. Confocal Imaging-Guided Laser Ablation of Basal Cell Carcinomas: An Ex Vivo Study. *J. Invest. Dermatol.* **2015**, *135* (2), 612–615. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- (166) Meng-Sheng Liao, Ming-Ju Huang, and J. D. W. Binding of O₂ and NO to Heme in Heme-Nitric Oxide/Oxygen-Binding (H-NOX) Proteins. A Theoretical Study. **2013**, *117* (35), 1–29. <https://doi.org/10.1021/jp403998u.Binding>.
- (167) Ah-Lim Tsai¹, Vladimir Berka¹, Faye Martin², Xiaolei Ma², Focco van den Akker², Marian Fabian³, and J. S. O. Is Nostoc H-NOX an NO Sensor or Redox Switch? *Biochemistry* **2010**, *49* (31), 6587–6599. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181a15ae8.Screening>.
- (168) Pan, J.; Yuan, H.; Zhang, X.; Zhang, H.; Xu, Q.; Zhou, Y.; Tan, L.; Nagawa, S.; Huang, Z. X.; Tan, X. Probing the Molecular Mechanism of Human Soluble Guanylate Cyclase Activation by NO in Vitro and in Vivo. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (September 2016), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep43112>.
- (169) Montfort, W. R.; Wales, J. A.; Weichsel, A. Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. *Antioxid. Redox Signal.* **2017**, *26* (3), 107–121. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6693>.
- (170) Wu, G.; Martin, E.; Berka, V.; Liu, W.; Garcin, E. D.; Tsai, A. L. A New Paradigm for Gaseous Ligand Selectivity of Hemoproteins Highlighted by Soluble Guanylate Cyclase. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Elsevier Inc. January 1, 2021, p 111267. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111267>.

- (171) *The Porphyrin Handbook: The Iron and Cobalt Pigments: Biosynthesis, Structure and Degradation*; Kadish, K. M., Smith, K. M., Guillard, R., Eds.; Elsevier Inc., 2003; Vol. 12. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-22715-2>.
- (172) Guillaud, G.; Simon, J.; Germain, J. P. Metallophthalocyanines Gas Sensors, Resistors and Field Effect Transistors. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *178–180* (PART 2), 1433–1484. [https://doi.org/10.1016/s0010-8545\(98\)00177-5](https://doi.org/10.1016/s0010-8545(98)00177-5).
- (173) Rakow, N. A.; Suslick, K. S. A Colorimetric Sensor Array for Odour Visualization. *Nature* **2000**, *406* (6797), 710–713. <https://doi.org/10.1038/35021028>.
- (174) Brulé, E.; De Miguel, Y. R. Supported Metalloporphyrin Catalysts for Alkene Epoxidation. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (4), 599–609. <https://doi.org/10.1039/b509985d>.
- (175) Zampronio, E. C.; Gotardo, M. C. A. F.; Assis, M. D.; Oliveira, H. P. Catalytic Oxidation of Cyclohexane and Cyclooctene over a New Metalloporphyrin Supported on VOPO₄ Catalyst. *Catal. Letters* **2005**, *104* (1–2), 53–56. <https://doi.org/10.1007/s10562-005-7435-0>.
- (176) Flechtner, K.; Kretschmann, A.; Steinrück, H.-P.; Gottfried, J. M. NO-Induced Reversible Switching of the Electronic Interaction between a Porphyrin-Coordinated Cobalt Ion and a Silver Surface. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (40), 12110–12111. <https://doi.org/10.1021/ja0756725>.
- (177) Zhang, H.; Tian, X. T.; Shang, Y.; Li, Y. H.; Yin, X. B. Theranostic Mn-Porphyrin Metal-Organic Frameworks for Magnetic Resonance Imaging-Guided Nitric Oxide and Photothermal Synergistic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (34), 28390–28398. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b09680>.
- (178) Franke, A.; Stochel, G.; Jung, C.; Eldik, R. Van. Substrate Binding Favors Enhanced NO Binding to P450 Cam Then Bubbling through a Gas Scrubbing Bottle Containing 5 M. *Changes* **2004**, *55* (3), 4181–4191.
- (179) Chen, O.; Groh, S.; Liechty, A.; Ridge, D. P. Binding of Nitric Oxide to Iron(II) Porphyrins: Radiative Association, Blackbody Infrared Radiative Dissociation, and Gas-Phase Association Equilibrium [9]. *Journal of the American Chemical Society*. UTC December 22, 1999, pp 11910–11911. <https://doi.org/10.1021/ja991477h>.
- (180) Franke, A.; Hessenauer-Ilicheva, N.; Meyer, D.; Stochel, G.; Woggon, W.-D.; van Eldik, R. Thermodynamic and Kinetic Studies on the Binding of Nitric Oxide to a New Enzyme Mimic of Cytochrome P450. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (41), 13611–13624. <https://doi.org/10.1021/ja060650o>.
- (181) Angelelli, F.; Chiavarino, B.; Crestoni, M. E.; Fornarini, S. Binding of Gaseous Fe(III)-Heme Cation to Model Biological Molecules: Direct Association and Ligand Transfer Reactions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16* (4), 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.01.011>.
- (182) Tamura, A.; Privalov, P. L. The Entropy Cost of Protein Association. *J. Mol. Biol.* **1997**, *273* (5), 1048–1060. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1368>.
- (183) Radoń, M.; Pierloot, K. Binding of CO, NO, and O₂ to Heme by Density Functional and Multireference Ab Initio Calculations. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (46), 11824–11832. <https://doi.org/10.1021/jp806075b>.
- (184) Blomberg, L. M.; Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M. A Theoretical Study on the Binding of O₂, NO and CO to Heme Proteins. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 949–958. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.02.014>.
- (185) Rovira, C.; Kunc, K.; Ballone, P.; Parrinello, M. Equilibrium Geometries and Electronic Structure of Iron-Porphyrin Complexes: A Density Functional Study. *Structure* **1997**, *5* (12), 8914–8925.
- (186) Radoń, M.; Pierloot, K. Binding of CO, NO, and O₂ to Heme by Density Functional and

- Multireference Ab Initio Calculations. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (46), 11824–11832. <https://doi.org/10.1021/jp806075b>.
- (187) Schrödinger Inc. Jaguar Version 6.0. New York 2005.
- (188) Amos, R. D.; Bernhardsson, A.; Berning, A.; Celani, P.; Cooper, D. L.; Deegan, M. J. O.; Dobbyn, A. J.; Eckert, F.; Hampel, C.; Hetzer, G.; Knowles, P. J.; Korona, T.; Lindh, R.; Lloyd, A. W.; McNicholas, S. J.; Manby, F. R.; Meyer, W.; Mura, M. E.; Nickl, H.-J. MOLPRO, a Package of Ab Initio Programs Designed by H.-J. Werner and P. J. Knowles, Version 2002.3; University of Birmingham, U.K., 2002. 2002.
- (189) Dunning, T. H. Gaussian Basis Sets for Use in Correlated Molecular Calculations. I. The Atoms Boron through Neon and Hydrogen. *J. Chem. Phys.* **1989**, *90* (2), 1007–1023. <https://doi.org/10.1063/1.456153>.
- (190) Balabanov, N. B.; Peterson, K. a. Systematically Convergent Basis Sets for Transition Metals. I. All-Electron Correlation Consistent Basis Sets for the 3d Elements Sc-Zn. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123* (6), 64107. <https://doi.org/10.1063/1.1998907>.
- (191) Strickland, N.; Harvey, J. N. Spin-Forbidden Ligand Binding to the Ferrous-Heme Group: Ab Initio and DFT Studies. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (4), 841–852. <https://doi.org/10.1021/jp064091j>.
- (192) Helgaker, T.; Klopper, W.; Koch, H.; Noga, J. Basis-Set Convergence of Correlated Calculations on Water. **1997**, *106* (23).
- (193) Karton, A.; Rabinovich, E.; Martin, J. M. L.; Ruscic, B. W4 Theory for Computational Thermochemistry: In Pursuit of Confident Sub-KJ/Mol Predictions. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125* (14), 144108. <https://doi.org/10.1063/1.2348881>.
- (194) Lu, A. Y. H.; Junk, K. W.; Coon, M. J. Resolution of the Cytochrome P-450-Containing ω -Hydroxylation System of Liver Microsomes into Three Components. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244* (13), 3714–3721. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83427-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83427-5).
- (195) De Vries, S.; Schröder, I. Comparison between the Nitric Oxide Reductase Family and Its Aerobic Relatives, the Cytochrome Oxidases. In *Biochemical Society Transactions*; Portland Press, 2002; Vol. 30, pp 662–667. <https://doi.org/10.1042/BST0300662>.
- (196) Richardson, D.; Felgate, H.; Watmough, N.; Thomson, A.; Baggs, E. Mitigating Release of the Potent Greenhouse Gas N₂O from the Nitrogen Cycle - Could Enzymic Regulation Hold the Key? *Trends in Biotechnology*. Elsevier Current Trends July 1, 2009, pp 388–397. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.03.009>.
- (197) Chao, L. Y.; Rine, J.; Marletta, M. A. Spectroscopic and Kinetic Studies of Nor1, a Cytochrome P450 Nitric Oxide Reductase from the Fungal Pathogen *Histoplasma Capsulatum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *480* (2), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.09.001>.
- (198) Harris, D. L. Cytochrome P450nor: A Nitric Oxide Reductase—Structure, Spectra, and Mechanism. *Int. J. Quantum Chem.* **2002**, *88*, 183–200. <https://doi.org/10.1002/qua.10111>.
- (199) Martin, E.; Berka, V.; Bogatenkova, E.; Murad, F.; Tsai, A.-L. L. Ligand Selectivity of Soluble Guanylyl Cyclase: Effect of the Hydrogen-Bonding Tyrosine in the Distal Heme Pocket on Binding of Oxygen, Nitric Oxide, and Carbon Monoxide. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (38), 27836–27845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601078200>.
- (200) Martin, E.; Berka, V.; Sharina, I.; Tsai, A. L. Mechanism of Binding of NO to Soluble Guanylyl Cyclase: Implication for the Second NO Binding to the Heme Proximal Site. *Biochemistry* **2012**, *51* (13), 2737–2746. <https://doi.org/10.1021/bi300105s>.
- (201) Childers, K. C.; Yao, X. Q.; Giannakoulis, S.; Amason, J.; Hamelberg, D.; Garcin, E. D. Synergistic Mutations in Soluble Guanylyl Cyclase (SGC) Reveal a Key Role for Interfacial Regions in the SGC Activation Mechanism. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (48), 18451–18464. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011010>.

- (202) Boon, E. M.; Marletta, M. A. Ligand Specificity of H-NOX Domains: From SGC to Bacterial NO Sensors. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99* (4), 892–902. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.12.016>.
- (203) Wang, P. H.; De Sancho, D.; Best, R. B.; Blumberger, J. *Computation of Rate Constants for Diffusion of Small Ligands to and from Buried Protein Active Sites*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2016; Vol. 578. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.05.039>.
- (204) De Sancho, D.; Kubas, A.; Wang, P. H.; Blumberger, J.; Best, R. B. Identification of Mutational Hot Spots for Substrate Diffusion: Application to Myoglobin. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (4), 1919–1927. <https://doi.org/10.1021/ct5011455>.
- (205) Adam Kubas; Orain, C.; Sancho, D. De; Saujet, L.; Sensi, M.; Gauquelin, C.; Isabelle Meynial-Salles, P. S.; Bottin, H.; Baffert, C.; Fourmond, V.; Best, R.; Jochen Blumberger, C. L. Mechanism of O₂ Diffusion and Reduction in FeFe Hydrogenase. *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 88–95. <https://doi.org/10.1038/nchem.2592>.
- (206) Wang, P.; Best, R. B.; Blumberger, J. Multiscale Simulation Reveals Multiple Pathways for H₂ and O₂ Transport in a [NiFe]-Hydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (10), 3548–3556. <https://doi.org/10.1021/ja109712q>.
- (207) Wang, P.; Blumberger, J. Mechanistic Insight into the Blocking of CO Diffusion in [NiFe]-Hydrogenase Mutants through Multiscale Simulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (17), 6399–6404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121176109>.
- (208) Draghi, F.; Miele, A. E.; Travaglini-Allocatelli, C.; Vallone, B.; Brunori, M.; Gibson, Q. H.; Olson, J. S. Controlling Ligand Binding in Myoglobin by Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (9), 7509–7519. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109206200>.
- (209) Carver, T. E.; Rohlf, R. J.; Olson, J. S.; Gibson, Q. H.; Blackmore, R. S.; Springer, B. A.; Sligar, S. G. Analysis of the Kinetic Barriers for Ligand Binding to Sperm Whale Myoglobin Using Site-Directed Mutagenesis and Laser Photolysis Techniques. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (32), 20007–20020.
- (210) Moore, E. G.; Gibson, Q. H. Cooperativity in the Dissociation of Nitric Oxide from Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251* (9), 2788–2794.
- (211) Draghi, F.; Miele, A. E.; Travaglini-Allocatelli, C.; Vallone, B.; Brunori, M.; Gibson, Q. H.; Olson, J. S. Controlling Ligand Binding in Myoglobin by Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (9), 7509–7519. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109206200>.
- (212) Sadrearhami, Z.; Nguyen, T. K.; Namivandi-Zangeneh, R.; Jung, K.; Wong, E. H. H.; Boyer, C. Recent Advances in Nitric Oxide Delivery for Antimicrobial Applications Using Polymer-Based Systems. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (19), 2945–2959. <https://doi.org/10.1039/c8tb00299a>.
- (213) Sung Ryul Lee, Bernd Nilius, and J. H. Gaseous Signaling Molecules in Cardiovascular Function: From Mechanisms to Clinical Translation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2018**, *174* (April), 81–156. <https://doi.org/10.1007/112>.
- (214) Wu, G.; Liu, W.; Berka, V.; Tsai, A. Gaseous Ligand Selectivity of the H-NOX Sensor Protein from *Shewanella Oneidensis* and Comparison to Those of Other Bacterial H-NOXs and Soluble Guanylyl Cyclase. *Biochimie* **2017**, *140*, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.06.014>.
- (215) Serwer, L.; Harris, E.; Romero, J.; Davis, A.; Kapp, G.; Santos, R.; Ozawa, T.; Cary, S.; James, C. Novel Oxygen Carrier Proteins, H-NOX, Reduce Tumor Hypoxia and Act as Radiosensitizers in an Orthotopic Mouse Model of Human Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2012**, *84* (3), S707. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.07.1891>.
- (216) Le Moan, N.; Getz, J.; Ng, S.; Davis, T.; Bedard, C.; Davis, A.; Leung, P.; Serwer, L.; Tanaka, K.; Keating, T.; Yan, F.; Winger, J.; Cary, S.; Krtolica, A. ET-32 * HYPOXIA REDUCTION IN INTRACRANIAL GLIOBLASTOMA MODELS BY OMX-4.80P, A PEGylated ENGINEERED H-NOX OXYGEN CARRIER THAT IS LONG-LASTING

- IN CIRCULATION AND SAFE. *Neuro. Oncol.* **2014**, *16* (suppl 5), v86–v86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou255.32>.
- (217) Tsai, A.-L.; Berka, V.; Martin, E.; Olson, J. S. A “Sliding Scale Rule” for Selectivity among NO, CO, and O₂ by Heme Protein Sensors. *Biochemistry* **2012**, *51* (1), 172–186. <https://doi.org/10.1021/bi2015629>.
- (218) Hespen, C. W.; Bruegger, J. J.; Guo, Y.; Marletta, M. A. Native Alanine Substitution in the Glycine Hinge Modulates Conformational Flexibility of Heme Nitric Oxide/Oxygen (H-NOX) Sensing Proteins. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (6), 1631–1639. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00248>.
- (219) Wu, G.; Liu, W.; Berka, V.; Tsai, A. H - NOX from *Clostridium Botulinum*, like H - NOX from *Thermoanaerobacter Tengcongensis*, Binds Oxygen but with a Less Stable Oxyferrous Heme Intermediate. **2015**. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00994>.
- (220) Olson, J. S.; Soman, J.; Phillips, G. N. Ligand Pathways in Myoglobin: A Review of Trp Cavity Mutations. *IUBMB Life* **2007**, *59* (8–9), 552–562. <https://doi.org/10.1080/15216540701230495>.
- (221) Leroux, F.; Dementin, S.; Burlat, B.; Cournac, L.; Volbeda, A.; Champ, S.; Martin, L.; Guigliarelli, B.; Bertrand, P.; Fontecilla-Camps, J.; Rousset, M.; Léger, C. Experimental Approaches to Kinetics of Gas Diffusion in Hydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (32), 11188–11193. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803689105>.
- (222) Wintera, M. B.; Herzik, M. A.; Kuriyana, J.; Marletta, M. A. Tunnels Modulate Ligand Flux in a Heme Nitric Oxide/Oxygen Binding (H-NOX) Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (43). <https://doi.org/10.1073/pnas.1114038108>.
- (223) Lábás, A.; Menyhárd, D. K.; Harvey, J. N.; Oláh, J. First Principles Calculation of the Reaction Rates for Ligand Binding to Myoglobin: The Cases of NO and CO. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24* (20), 5350–5358. <https://doi.org/10.1002/chem.201704867>.
- (224) Cohen, J.; Kim, K.; King, P.; Seibert, M.; Schulten, K. Finding Gas Diffusion Pathways in Proteins: Application to O₂ and H₂ Transport in CpI [FeFe]-Hydrogenase and the Role of Packing Defects. *Structure* **2005**, *13* (9), 1321–1329. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.05.013>.
- (225) Zhang, Y.; Lu, M.; Cheng, Y.; Li, Z. H-NOX Domains Display Different Tunnel Systems for Ligand Migration. *J. Mol. Graph. Model.* **2010**, *28* (8), 814–819. <https://doi.org/10.1016/j.jm gm.2010.02.007>.
- (226) Capece, L.; Estrin, D. A.; Marti, M. A. Dynamical Characterization of the Heme NO Oxygen Binding (HNOX) Domain. Insight into Soluble Guanylate Cyclase Allosteric Transition. *Biochemistry* **2008**, *47* (36), 9416–9427. <https://doi.org/10.1021/bi800682k>.
- (227) Zhang, Y.; Liu, L.; Wu, L.; Li, S.; Li, F.; Li, Z. Theoretical Investigation on the Diatomic Ligand Migration Process and Ligand Binding Properties in Non-O₂-Binding H-NOX Domain. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2013**, *81* (8), 1363–1376. <https://doi.org/10.1002/prot.24279>.
- (228) Wintera, M. B.; Herzik, M. A.; Kuriyana, J.; Marletta, M. A. Tunnels Modulate Ligand Flux in a Heme Nitric Oxide/Oxygen Binding (H-NOX) Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (43), E881–E889. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114038108>.
- (229) Kraus, D. W.; Wittenberg, J. B. Hemoglobins of the *Lucina Pectinata*/Bacteri Symbiosis. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (25), 16043–16053. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90654-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90654-8).
- (230) Omnix, I. Polymeric Forms of H-NOX Proteins, 2013.
- (231) Aktas, D. F.; Cook, P. F. A Lysine-Tyrosine Pair Carries out Acid-Base Chemistry in the Metal Ion-Dependent Pyridine Dinucleotide-Linked β -Hydroxyacid Oxidative Decarboxylases. *Biochemistry* **2009**, *48* (16), 3565–3577. <https://doi.org/10.1021/bi8022976>.

- (232) Hayashi-Iwasaki, Y.; Oshima, T. Purification and Characterization of Recombinant 3-Isopropylmalate Dehydrogenases from *Thermus Thermophilus* and Other Microorganisms. *Methods Enzymol.* **2000**, *324*, 301–322. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)24240-7](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)24240-7).
- (233) Palló, A.; Oláh, J.; Gráczér, É.; Merli, A.; Závodszy, P.; Weiss, M. S.; Vas, M. Structural and Energetic Basis of Isopropylmalate Dehydrogenase Enzyme Catalysis. *FEBS J.* **2014**, *281* (22), 5063–5076. <https://doi.org/10.1111/febs.13044>.
- (234) Gráczér, É.; Konarev, P. V.; Szimlér, T.; Bacsó, A.; Bodonyi, A.; Svergun, D. I.; Závodszy, P.; Vas, M. Essential Role of the Metal-Ion in the IPM-Assisted Domain Closure of 3-Isopropylmalate Dehydrogenase. *FEBS Lett.* **2011**, *585* (20), 3297–3302. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.013>.
- (235) Gonçalves, S.; Miller, S. P.; Carrondo, M. A.; Dean, A. M.; Matias, P. M. Induced Fit and the Catalytic Mechanism of Isocitrate Dehydrogenase. *Biochemistry* **2012**, *51* (36), 7098–7115. <https://doi.org/10.1021/bi300483w>.
- (236) Berdis, A. J.; Cook, P. F. Chemical Mechanism of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from *Candida Utilis* from PH Studies. *Biochemistry* **1993**, *32* (8), 2041–2046. <https://doi.org/10.1021/bi00059a022>.
- (237) Price, N. E.; Cook, P. F. Kinetic and Chemical Mechanisms of the Sheep Liver 6-Phosphogluconate Dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *336* (2), 215–223. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0551>.
- (238) Quartararo, C. E.; Hazra, S.; Hadi, T.; Blanchard, J. S. Structural, Kinetic and Chemical Mechanism of Isocitrate Dehydrogenase-1 from *Mycobacterium Tuberculosis*. *Biochemistry* **2013**, *52* (10), 1765–1775. <https://doi.org/10.1021/bi400037w>.
- (239) Gonçalves, S.; Miller, S. P.; Carrondo, M. A.; Dean, A. M.; Matias, P. M. Induced Fit and the Catalytic Mechanism of Isocitrate Dehydrogenase. *Biochemistry* **2012**, *51* (36), 7098–7115. <https://doi.org/10.1021/bi300483w>.
- (240) Miller, S. P.; Carrondo, M. A.; Dean, A. M.; Matias, P. M. Induced Fit and the Catalytic Mechanism of Isocitrate Dehydrogenase. **2012**.
- (241) Tian, B. X.; Eriksson, L. A. Catalytic Mechanism and Roles of Arg197 and Thr183 in the *Staphylococcus Aureus* Sortase A Enzyme. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (44), 13003–13011. <https://doi.org/10.1021/jp2058113>.
- (242) Liao, R. Z.; Thiel, W. Convergence in the QM-Only and QM/MM Modeling of Enzymatic Reactions: A Case Study for Acetylene Hydratase. *J. Comput. Chem.* **2013**, *34* (27), 2389–2397. <https://doi.org/10.1002/jcc.23403>.
- (243) Pérez-Gallegos, A.; Garcia-Viloca, M.; González-Lafont, À.; Lluch, J. M. A QM/MM Study of the Associative Mechanism for the Phosphorylation Reaction Catalyzed by Protein Kinase A and Its D166A Mutant. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2014**, *28* (11), 1077–1091. <https://doi.org/10.1007/s10822-014-9786-3>.
- (244) Reductase, D.; Garcia-viloca, M.; Truhlar, D. G.; Gao, J. Reaction-Path Energetics and Kinetics of the Hydride Transfer Reaction Catalyzed. *Society* **2003**, *1700* (2), 13558–13575.
- (245) Szarek, P.; Dyguda-Kazimierowicz, E.; Tachibana, A.; Sokalski, W. A. Physical Nature of Intermolecular Interactions within CAMP-Dependent Protein Kinase Active Site: Differential Transition State Stabilization in Phosphoryl Transfer Reaction. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (37), 11819–11826. <https://doi.org/10.1021/jp8040633>.
- (246) Bhushan, B. Biomimetics: Lessons from Nature - an Overview. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2009**, *367* (1893), 1445–1486. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0011>.
- (247) Ball, P. Natural Strategies for the Molecular Engineer. *Nanotechnology* **2002**, *13* (5), R15–R28. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/13/5/201>.

- (248) Bar-Cohen, Y. Biomimetics - Using Nature to Inspire Human Innovation. *Bioinspiration and Biomimetics* **2006**, *1* (1), P1–P12. <https://doi.org/10.1088/1748-3182/1/1/P01>.
- (249) Bhushan, B.; Jung, Y. C.; Koch, K. Micro-, Nano- And Hierarchical Structures for Superhydrophobicity, Self-Cleaning and Low Adhesion. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2009**, *367* (1894), 1631–1672. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0014>.
- (250) Zhou, M.; Pesika, N.; Zeng, H.; Tian, Y.; Israelachvili, J. Recent Advances in Gecko Adhesion and Friction Mechanisms and Development of Gecko-Inspired Dry Adhesive Surfaces. *Friction* **2013**, *1* (2), 114–129. <https://doi.org/10.1007/s40544-013-0011-5>.
- (251) *Food and Agriculture Organisation of the United Nations, World Fertilizer Trends and Outlook to 2020 – Summary Report, 2017.*; 2017.
- (252) Renner, J. N.; Greenlee, L. F.; Ayres, K. E.; Herring, A. M. Electrochemical Synthesis of Ammonia: A Low Pressure, Low Temperature Approach. *Electrochem. Soc. Interface* **2015**, *24* (2), 51–57. <https://doi.org/10.1149/2.F04152if>.
- (253) Qiu, P.; Huang, C.; Dong, G.; Chen, F.; Zhao, F.; Yu, Y.; Liu, X.; Li, Z.; Wang, Y. Plasmonic Gold Nanocrystals Simulated Efficient Photocatalytic Nitrogen Fixation over Mo Doped W₁₈O₄₉ Nanowires. *J. Mater. Chem. A* **2021**, *in press*. <https://doi.org/10.1039/D1TA03339E>.
- (254) Xue, X.; Chen, R.; Yan, C.; Zhao, P.; Hu, Y.; Zhang, W.; Yang, S.; Jin, Z. Review on Photocatalytic and Electrocatalytic Artificial Nitrogen Fixation for Ammonia Synthesis at Mild Conditions: Advances, Challenges and Perspectives. *Nano Research*. Tsinghua University Press June 1, 2019, pp 1229–1249. <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2268-5>.
- (255) Stucke, N.; Flöser, B. M.; Weyrich, T.; Tucek, F. Nitrogen Fixation Catalyzed by Transition Metal Complexes: Recent Developments. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2018**, *2018* (12), 1337–1355. <https://doi.org/10.1002/ejic.201701326>.
- (256) Anderson, J. S.; Rittle, J.; Peters, J. C. Catalytic Conversion of Nitrogen to Ammonia by an Iron Model Complex. *Nature* **2013**, *501* (7465), 84–87. <https://doi.org/10.1038/nature12435>.
- (257) Creutz, S. E.; Peters, J. C. Catalytic Reduction of N₂ to NH₃ by an Fe-N₂ complex Featuring a C-Atom Anchor. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (3), 1105–1115. <https://doi.org/10.1021/ja4114962>.
- (258) Del Castillo, T. J.; Thompson, N. B.; Peters, J. C. A Synthetic Single-Site Fe Nitrogenase: High Turnover, Freeze-Quench ⁵⁷Fe Mössbauer Data, and a Hydride Resting State. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (16), 5341–5350. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b01706>.
- (259) Chalkley, M. J.; Del Castillo, T. J.; Matson, B. D.; Peters, J. C. Fe-Mediated Nitrogen Fixation with a Metallocene Mediator: Exploring pKa Effects and Demonstrating Electrocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (19), 6122–6129. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b02335>.
- (260) Chalkley, M. J.; Del Castillo, T. J.; Matson, B. D.; Roddy, J. P.; Peters, J. C. Catalytic N₂-to-NH₃ Conversion by Fe at Lower Driving Force: A Proposed Role for Metallocene-Mediated PCET. *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3* (3), 217–223. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00014>.
- (261) Van Lenthe, E.; Baerends, E. J.; Snijders, J. G. Relativistic Regular Two-Component Hamiltonians. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99* (6), 4597–4610. <https://doi.org/10.1063/1.466059>.
- (262) Chalkley, M. J.; Del Castillo, T. J.; Matson, B. D.; Roddy, J. P.; Peters, J. C. Catalytic N₂-to-NH₃ Conversion by Fe at Lower Driving Force: A Proposed Role for Metallocene-Mediated PCET. *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3* (3), 217–223. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00014>.

- (263) Studt, F.; Tucek, F. Energetics and Mechanism of a Room-Temperature Catalytic Process for Ammonia Synthesis (Schrock Cycle): Comparison with Biological Nitrogen Fixation. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (35), 5639–5642. <https://doi.org/10.1002/anie.200501485>.
- (264) Thimm, W.; Gradert, C.; Broda, H.; Wennmohs, F.; Neese, F.; Tucek, F. Free Reaction Enthalpy Profile of the Schrock Cycle Derived from Density Functional Theory Calculations on the Full [MoHIPTN3N] Catalyst. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (19), 9248–9255. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b00787>.
- (265) Matson, B. D.; Peters, J. C. Fe-Mediated HER vs N2RR: Exploring Factors That Contribute to Selectivity in P3EFe(N2) (E = B, Si, C) Catalyst Model Systems. *ACS Catal.* **2018**, *8* (2), 1448–1455. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b03068>.
- (266) Rittle, J.; Peters, J. C. An Fe-N2 Complex That Generates Hydrazine and Ammonia via Fe=NNH2: Demonstrating a Hybrid Distal-to-Alternating Pathway for N2 Reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (12), 4243–4248. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b01230>.
- (267) Fong, H.; Moret, M. E.; Lee, Y.; Peters, J. C. Heterolytic H2 Cleavage and Catalytic Hydrogenation by an Iron Metallaboratrane. *Organometallics* **2013**, *32* (10), 3053–3062. <https://doi.org/10.1021/om400281v>.
- (268) Ballmann, J.; Munhá, R. F.; Fryzuk, M. D. The Hydride Route to the Preparation of Dinitrogen Complexes. *Chemical Communications*. Royal Society of Chemistry February 3, 2010, pp 1013–1025. <https://doi.org/10.1039/b922853e>.
- (269) Creutz, S. E.; Peters, J. C. Catalytic Reduction of N2 to NH3 by an Fe-N2 Complex Featuring a C-Atom Anchor. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (3), 1105–1115. <https://doi.org/10.1021/ja4114962>.
- (270) Lee, Y.; Kinney, R. A.; Hoffman, B. M.; Peters, J. C. A Nonclassical Dihydrogen Adduct of $S = 1 / 2$ Fe(I). *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (41), 16366–16369. <https://doi.org/10.1021/ja207003m>.
- (271) Fong, H.; Peters, J. C. Hydricity of an Fe–H Species and Catalytic CO2 Hydrogenation. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (11), 5124–5135. <https://doi.org/10.1021/ic502508p>.
- (272) Thompson, N. B.; Green, M. T.; Peters, J. C. Nitrogen Fixation via a Terminal Fe(IV) Nitride. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (43), 15312–15315. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b09364>.
- (273) Hoops, S.; Sahle, S.; Gauges, R.; Lee, C.; Pahle, J.; Simus, N.; Singhal, M.; Xu, L.; Mendes, P.; Kummer, U. COPASI--a COMplex PATHway SIMulator. *Bioinformatics* **2006**, *22* (24), 3067–3074. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl485>.
- (274) Hooke, R.; Jeeves, T. A. ``Direct Search'' Solution of Numerical and Statistical Problems. *J. ACM* **1961**, *8* (2), 212–229. <https://doi.org/10.1145/321062.321069>.
- (275) Novák, B.; Tyson, J. J. Design Principles of Biochemical Oscillators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group December 30, 2008, pp 981–991. <https://doi.org/10.1038/nrm2530>.
- (276) Tyson, J. J.; Chen, K. C.; Novak, B. Sniffers, Buzzers, Toggles and Blinkers: Dynamics of Regulatory and Signaling Pathways in the Cell. *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd April 1, 2003, pp 221–231. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00017-6).