

Válasz Ferenczy György bírálataira

Köszönöm Dr. Ferenczy György úrnak, hogy értekezésemet gondosan elolvasta és a feltett kérdéseit. A kérdésekre az alábbiakban válaszolok.

Az ismertett QM/MM számítások az entalpia meghatározására irányulnak, és eredményeik így nem vehetők közvetlenül össze a kísérletileg mérhető vagy származtatható szabadenergiával. Hogyan látja a hiányzó entrópius tag szerepét a vizsgált problémákban, illetve lát-e lehetőséget ennek figyelembevételére átmenetifém tartalmú kiterjedt rendszerekben?

Kémiai és biológiai rendszerek vizsgálata esetén valóban a legtöbb kísérleti eredmény a rendszerek szabadentalpia-változásaihoz kapcsolódik, hiszen mind a kémiai termodinamikát mind a kinetikát az határozza meg. Gázfázisú, s viszonylag kisebb méretű rendszerek esetén a legtöbb kvantumkémiai programcsomag ideális gáz állapotot (vagyis nem kölcsönható részecskéket) feltételezve és a merev rotor-harmonikus oszcillátor (RRHO) közelítést alkalmazva használja fel a statisztikus termodinamikai összefüggéseket arra, hogy a molekuláris energiaszintekből makroszkopikus tulajdonságokat származtasson, többek között az entalpiát és entrópiát, így a szabadentalpiát is.

Biomolekulák esetében azonban a rendszer szabadentalpia-változásának meghatározása jóval bonyolultabb, főként az entrópia megbecslésének nehézségei miatt. Biomolekulák esetén az RRHO megközelítés számos okból nehézségekbe ütközik: (i) A több ezer atomból álló rendszerek esetén nagyon drága vagy gyakorlatilag kivitelezhetetlen a teljes rezgési analízis (ii) sok, anharmonikus szabadsági fokkal rendelkeznek általában a szolvatált biomolekulák, amelyekre a harmonikus közelítés nem jogos, (iii) Az RRHO megközelítés stacionárius pontban alkalmazható (minimum vagy átmeneti állapot) amelyet energiaminimalizáló algoritmusokkal határozhatunk meg. Ugyanakkor nagy rendszerek esetén nagyon sok, hasonló energiájú szerkezet létezik, s nem foghatjuk rá egyre se, hogy ez "a" reprezentatív szerkezet.

Éppen ezért biomolekulák esetén olyan mintavételező módszereket érdemes használni, amelyet képesek felderíteni a rendszer konfigurációs terét legalábbis lokálisan. A legelterjedtebb módszerek rendszerek szabadentalpia változásainak vizsgálatára az Szabad Energia Perturbáció (Free Energy Perturbation, FEP,) és az esernyő mintavételezés (Umbrella Sampling), majd a szimulációs adatokat feldolgozva, pl. a

WHAM (Weighted Histogram Analysis Method) segítségével juthatunk a szabadentalpia-változás értékekhez. Ezek a módszerek nagyon nagy számú mintavételezési ponton alapulnak. Mivel egyszerű molekulamechanikai erőterek használatával kémiai kötések felbomlása és kialakulása nem vizsgálható, elerjedt, hogy enzimekatalizált reakciók esetén hibrid kvantummechanikai molekulamechanikai potenciálokat használnak (QM/MM) a reakciók energetikai viszonyainak felderítésére. Ugyanakkor, mivel nagyon nagy számú pontról van szó, általában csak szemiempirikus kvantumkémiai módszerek használhatóak ezekben az esetekben, mint pl. az AM1, PM3 vagy DFTB.

Átmenetifém-tartalmú enzimek esetén azonban a szemiempirikus módszerek sajnos gyakran nem adnak jó eredményeket^{1,2}, sem a különböző konformációk energiáját tekintve, sem az aktiválási energiákat, így a jelenleg könnyen elérhető szemiempirikus módszerek várhatóan nem használhatóak fel.

Felmerül a kérdés, hogy vajon DFT segítségével vizsgálhatnánk-e ezeket a rendszereket a mai számítási erőforrásainkkal. Ehhez végezzünk el egy egyszerű becslést. Esernyő-mintavételezés esetén egy tipikus mintavételezési ablakban végezzünk el egy 50 ps hosszúságú szimulációt 0,5 fs lépésközzel. Ez összesen 100 000 energiaszámítási lépést jelent. Ha sikerülne egy vas-porfirin komplexet tartalmazó aktív helyen egy DFT számítást elvégezni 1 perc alatt, amelyről feltételezzük, hogy jó egyezést mutatnak a magasabb szintű módszerekkel, akkor ennek az ablaknak a vizsgálata 100 000 percbe kerülne, vagyis körülbelül 10 hetet venne igénybe. Még ha növelnénk a lépésközt, csökkentenénk a vizsgált szerkezetek számát, jelen számítási erőforrások mellett ez túl erőforrás igényes lenne. (Összehasonlításként hozzáteszem, hogy a 2 és fél éves klaszterünkön a hemtartalmú Compound I szerkezet kvartett állapotában 1 energiaszámítás 20 magon és 100 GB memória mellett a def2-TZVP funkcionállal a Gaussian 16 programcsomaggal 63perc/50perc/13 percbe tellett a M06-2X/ ω B97x-D /BP86 funkcionálokkal.

A fentiek alapján ebben a pillanatban még nem lehetne könnyedén DFT alapú QM/MM MD szimulációkat végezni hemtartalmú enzimekre. Érdemes ugyanakkor elgondolkodni a lehetséges irányokon, amelyek segítségével figyelembe tudnánk venni az entrópikus tagot is. Mindenképpen olyan módszerre van szükség, amely képes a fehérje legalább lokális konfigurációs terének feltérképezésre szűkösebb erőforrások mellett is. Ehhez használhatóak lennének pl. megfelelően parametrizált reaktív erőterek³ vagy az EVB (empirical valence bond) modell, amelyet használnak P450 enzimek modellezésére is.^{4,5} További lehetőség lenne speciális, átmenetifém-komplexekre

kifejlesztett erőterek, mint pl. az LFMM (ligand field molecular mechanics) használata.⁶ Szemiempirikus-potenciálok fejlesztése is fontos irány, amelyeket javítani, lehetne, pl. a d elektronok közötti korreláció jobb figyelembe vételével, erre tesz kísérletet a DFTB3+U módszer.⁷

A számítási módszerek és erőforrások gyors bővülésével egyre nagyobb teret nyernek a gépi tanulási módszerek is. Ezek alapgondolata, hogy a kémiai szerkezet és a potenciális energia közötti statisztikus kapcsolatot kihasználva tudják kombinálni az *ab initio* módszerek megbízhatóságát és a klasszikus erőterek gyorsaságát, anélkül hogy szükség lenne a kémiai kötések vagy kölcsönhatások ismeretére.⁸ Ugyanakkor ezek a módszerek még gyermekcipőben járnak.

Ahogy a fenti összefoglalás sugallja, érdemes lenne az entrópikus tagot figyelembe venni hemtartalmú enzimek esetén is, s számos kutatási irány létezik, amely egész biztosan fontos előrelépést fognak jelenteni a jövőben. Ugyanakkor ebben a pillanatban a legtöbb esetben még meg kell elégednünk azzal, hogy szabadentalpia-profilok helyett, csak energiaprofilokat tudunk meghatározni. A kámfor hidroxilációjának vizsgálata a (P450cam enzimben) alátámasztja ennek a megközelítésnek a hasznosságát.⁹ Azt találták, hogy az entrópikus tag gázfázisú modellekben jelentősnek tűnő entrópikus tag(-43 kJ/mol) az enzimben mindössze 2 kJ/molra csökken. Mindez azt erősíti, hogy a reakciók QM/MM energia változása és a szabadentalpia változása közötti különbség kicsi, amennyiben lokális változásokat vizsgálunk, mint pl. a CYP enzimek által katalizált hidrogén absztrakció. Ide szeretném még hozzáfűzni, hogy nyilvánvalóan, amikor a teljes kémiai reakciót vizsgáljuk (vagyis a ligandum kötődését, a kémiai reakciót és a termékek elengedését is, akkor feltétlenül szükségünk van a szabadentalpia vizsgálatára, messze nem elegendő az energiák vizsgálata.

A számítógépes modellezés alapvető kihívása, hogy az egyensúlyi állandó a szabadenergia exponenciális függvénye, és a szobahőmérsékleten közelítőleg 1.4 kcal/mol szabadenergia változás egy nagyságrend változást jelent az egyensúlyi állandóban. Ráadásul nagy rendszerek számított szabadenergia különbségeinek pontossága gyakran nehezen ellenőrizhető, ami megnehezíti az eredmények értékelését. Például a 10. ábra (32. oldal) Cpd I Fe-O kötési entalpiákat mutat különböző CYP izoformákban, amely kötési entalpiák a feltevés szerint összefüggenek a Cpd I oxidáló képességével. A kötési entalpiák bő 20 kcal/mol tartományt fednek le. Az ábra értékelése szerint „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.”, illetve az 1. tézisben

„A Cpd I- elektronszerkezete nagyon hasonló a vizsgált izoformákban (2C9, 2D6, 3A4 és P450cam), így a CYP enzimek reaktivitását és szelektivitását ez nem befolyásolja.” A fentiek fényében kérem jelöltet az idézett állítások kifejtésére, vagyis annak megvilágítására, hogy a 20 kcal/mol-t meghaladó kötéseenergia különbségek ellenére az ezzel összefüggő reaktivitásokat hasonlóknak tekinthetjük. Ennek kapcsán általánosan is érdekelne, hogy hogyan látja a kísérleteket támogató, esetleg azokat részben kiváltó kvantitatív modellezés lehetőségét az általa vizsgált területen.

A dolgozat 10. ábrája valóban azt mutatja, hogy a számított Fe-O kötéseenergia értékek kb 20 kcal/molos tartományt fednek le. Valószínűleg nem hangsúlyoztam kellően a dolgozatomban, hogy a következtetések nemcsak a számított átlagértékek, hanem azok szórásain is alapulnak. Vagyis szinte minden vizsgált rendszer esetében hasonlóan nagy tartományon belül változnak a kötéseenergia értékek, ugyanakkor az átlagok (amelyek nem tartalmazzák azokat a pontokat, ahol a vas-kén kötés felhasadt) 49,3 és 61,5 kcal/mol között változnak, s adott fehérje esetén is a ligandum jelenléte az enzimben jelentősen befolyásolja a számított értékeket. (Pl. 2C9 esetén a négy rendszerben az átlagok: 49,9-58,5 kcal/mol között változnak). Tehát abban az értelemben érvényesek az állításaim, hogy az adott módszerrel vizsgálva mi nem találtunk jelentős különbséget a vizsgált izoformák között. Ugyanakkor a számított eredmények és a nagyon nagy szórás valóban felveti annak a kérdését, mennyire pontosak a számításaink, s valóban nem tekinthetőek kvantitatívnak. Maga a vizsgálati módszer, (hogy a Cpd I szerkezetéből kitöröltük az oxigénatomot, s így határoztuk meg a Fe-O kötési energiát), amit alkalmaztunk jelentős elhanyagolásokat tartalmaz pl. a rendszer konformáció változását teljesen figyelmen kívül hagyja az alapállapot és a Cpd I forma között) így egyáltalán nem állíthatjuk, hogy pontos lenne. Noha nem pontos a módszer, mégis érdekes eredményeket szolgáltatott a különböző izoformák reaktivitásáról, amelyet nyilvánvalóan tovább is lehetne vizsgálni pontosabb módszerekkel, vagy több szerkezetet figyelembe véve.

Érdekes elgondolkodni a kísérleteket támogató vagy azokat részben kiváltó kvantitatív modellezés lehetőségeiről ezen a területen. Számomra ez a kérdés a Bíráló előző és következő kérdéseivel is szoros kapcsolatban van. Ahogy fentebb megvizsgáltuk, egyelőre nehéz CYP enzimek esetén a szabadentalpia-változások in silico modellezése, de jelentős fejlődés figyelhető meg a területen, tehát fontos változások lesznek ezen a területen is. Azt is említettem fentebb, hogy a teljes metabolikus folyamat modellezése nem egyezik meg magának a kémiai reakciónak a modellezésével, hiszen része a termékek enzimbe bejutása és a termékek elengedése is, amelyeket általában jelentős entrópia változás kísér (pl. változás a résztvevő tagok solvatációjában, fehérje

konformáció változása stb.). Bár korai kísérletek kudarcba fulladtak azzal kapcsolatban, hogy a szubsztrát CYP enzimbe történő bejutását modellezzék, újabban kezd ez is lehetségessé válni.¹⁰

A feltett kérdés számomra úgy kapcsolódik a következőhöz, hogy valójában milyen szempontból lenne fontos, hogy CYP enzimek reakcióit megbízhatóan, s ráadásul kvantitatívan tudjuk modellezni. Meg kell vizsgálni azt is, hogy az entrópikus tagon kívül vannak-e további nehézségek, amelyek a kvantitatív vizsgálatot megnehezítik.

A gyógyszeripar számára a CYP enzimek nagyon fontosak, hiszen ezek bontják le a gyógyszermolekulák kb. 80-90%-át, előgyógyszer-molekulák esetén általában ők felelősek az aktív molekulák szerkezeten belüli előállításáért. A CYP enzimek jelentősen befolyásolják a gyógyszerek vérszintjét és kiürülését, részt vesznek gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatásokban, és felelősek lehetnek vegyületek bioaktivációjáért is. Teljesen természetes, hogy hatalmas a gyógyszeripar érdeklődése a CYP enzimek reaktivitása iránt, s hatalmas metabolizmus-adatbázis készletek létezhetnek a nagyobb gyógyszergyárakon belül, amelyet fel tudnak használni metabolizmus predikcióra. Publikus szférában sokkal kisebb az elérhető információ¹¹ és szempontból is nagyon értékes lenne, ha képesek lennénk ezeket a reakciókat kvantitatív módon modellezni, hiszen szolgálhatnának referenciául egyszerűbb predikciós módszerek validálására.

De a helyzet meglehetősen bonyolult. A CYP enzimek egy nagyon különleges enzimszaládot alkotnak, működésük kifejezetten eltér az általánosan oktatott képtől, miszerint egy enzim egy szubsztrátot vagy esetleg egy fajta szubsztrátot bont le. A CYP enzimek poliszubsztrát enzimek, s ugyanazt a szubsztrátot több enzim is lebonthatja, s ugyanaz az enzim is képezhet többféle terméket adott szubsztrátból kiindulva. Ez már eleve megbonyolítja a modellezést. Az emberben legalább 57 féle CYP enzim található, amelyek közül a CYP 1A2, 2A13, 2C9, 2D6 és a 3A4 a legjelentősebbek gyógyszermetabolizmus szempontjából. A kvantitatív modellezéshez tudni kellene (1) melyik izoforma bontja le az adott molekulát (2) hogyan helyezkedik el a molekula az adott enzim aktív zsebében (3) milyen termékek képződhetnek (4) adott terméképződésének mekkora a reakció aktiválási szabadentalpiája, és szabadentalpia-változása. Vagyis gyakorlatban is hasznos eredményekhez nem biztos, hogy elegendő lenne egy szubsztrát és egy enzim reakcióját vizsgálni, érdemes lehetne ugyanannak a szubsztrátnak több enzimben történő metabolizmusát modellezni.

Úgy érzem, hogy jelen pillanatban a kutatások a kvantitatív modellezés helyett inkább arra irányulnak, hogy hogyan alkothatunk olyan modelleket, amellyel nagyszámú vegyület esetén statisztikusan a lehető legjobban megjósolhatjuk a CYP-mediált metabolizmus fontosabb kérdéseit. A legfontosabb *in silico* módszerek a

következő irányokat ölelik fel: (1) CYP enzim specificitás: Milyen izoforma szubsztrátjai (vagy esetleg inhibitora?) az adott molekula. Számos publikusan is elérhető predikációs szoftver létezik pl a CYPreact.¹² (2) Metabolizmus helyének megjóslása. A CYP enzimek monooxygenázok és sokféle oxidációs transzformációra képesek, mint pl. az alifás és aromás hidroxiláció, epoxidáció, heteroatom oxidáció, demetiláció stb. Egy vegyületen belül is általában potenciálisan több olyan pont létezhet, amely oxidálható a CYP enzim által. A különböző pontok reaktivitása becsülhető pl. SMARTCyp programmal.¹³ (3) CYP metabolit megjóslása. Ez gyakran történik tudásbázis alapon, egy nagy adatbázis és hozzátartozó szabályok segítségével, s ezeknek a megbízhatóságának a növeléséhez.

Összefoglalva tehát, jelenleg nehéznek tartom a CYP enzimek működésének kvantitatív modellezését, és egyelőre nem gondolom azt, hogy megbízhatóan ki lehetne váltani a kísérleteket, ha a CYP metabolitokat és azok arányát kellene megjóslani nagyobb vegyületek esetén. Ugyanakkor nagyon sok olyan irány létezik, amely a jövőben tényleg olyan elérhető módszerekhez vezethet, amellyel majd képesek leszünk ezeket a reakciókat is kvantitatívan modellezni, s ezzel akár referenciaként szolgáló adatokkal is szolgálhatunk adatbázisok számára.

*Érdekesnek találom a 2, 3 és 4-es tézispontokat, és a hozzájuk vezető vizsgálatokat. Eszerint a dextrometorfán CYP2D6 általi régiószelektív metabolizmusának értelmezéséhez szükséges az átmeneti állapotok kötőmódjait feltérképezni (2. tézispont). Az ösztrom metabolizmusánál a különböző CYP izozimek régiószelektivitása értelmezhető pusztán a kiindulási vegyület (ösztrom) kötőmódjának azonosításával (3. tézispont). Végül, ösztrogének C₂ és C₄ atomjainak hidroxilálását vizsgálva azt találta, hogy a májlizátummal kapott termékarányok jól leírhatók gázfázisú DFT számítások reakciógátjaival, vagyis az enzimekkel való kölcsönhatás figyelembevétele nélkül (4. tézispont; részleteiben pedig 44. oldal 3. táblázat). Ezek az eredmények tehát a CYP enzimek mechanizmusának és vizsgálati lehetőségeinek lényegesen különböző aspektusait mutatják, és arra utalnak, hogy a vizsgált rendszertől és problémától függően eltérő megközelítések lehetnek alkalmasak a CYP enzimek katalizálta reakciók vizsgálatára. **Jelölt véleményét szeretném kérni a fentiekről, és arról, hogy ezeknek milyen következményét látja a CYP enzimek modellezésében.***

Nagyon köszönöm ezt a kérdést, mert pontosan arra a képre irányul, amely kialakult bennem az elmúlt 15 évben. Hihetetlenül érdekesnek tartom a CYP enzimeket és a reaktivitásukat és a metabolizmus megbecslésének kérdéseit is. Ahogy az előző kérdésnél megmutattam a CYP-mediált metabolizmus megbecslése összetett kérdés, hiszen számos izoforma képes lehet ugyanannak a vegyületnek a lebontására (pl. az

össztront az emberi szervezetben 4 enzim is lebontja, különböző termékeket és termékkeverékeket eredményezve. A termékek anyagi minősége függ a potenciális reaktivitási helyek belső reaktivitásától (pl. az N-demetiláció gátja gázfázisban kifejezetten alacsonyabb, mint egy szénhidrogén-fragmens sp^2 szénatomjainak hidroxilációjáé)¹⁴, nyilvánvalóan befolyásolja, hogy egy adott aktív zsebben melyik pont van közel a vasionhoz, vagyis befolyásolja a szubsztrát kötődése az aktív zsebben. Ugyanakkor a CYP enzimek úgy evolválódtak, hogy minél többféle szubsztrátot le tudjanak bontani, így vannak specifikusabb izoformák (pl. a CYP 2D6 amelynek szubsztrátjai legtöbbször tartalmaznak egy aromás gyűrűt és egy bázikus nitrogént) s vannak olyan izoformák, pl. a CYP 3A4, amely aktív zsebe igen nagy és apoláris, akár két szubsztrát is elfér benne. Mindezek a kérdések vezettek ahhoz, hogy számos irányból közelíthető meg a metabolizmus kérdése, amelyet az előző kérdésnél már kifejtettem.

A fentiek alapján kísérleti eredmények nélkül nagyon nehéz lehet megbecsülni a vegyületek metabolizmusának minden aspektusát. Meg lehet vizsgálni, hogy vajon milyen izoforma fogja lebontani az adott vegyületet, vajon melyik ponton oxidálódik vagy milyen termék képződik, de mindegyik kérdés megválaszolása bizonytalanságokat rejt magában. Éppen emiatt szerintem egyelőre nagy a hibalehetőség a metabolitok megbecslése során, s nagyon fontos, hogy kísérletekkel összevetve is tudjuk vizsgálni az eredményeket.

Viszont nagyon szeretnék még pár gondolatot hozzátenni ehhez a kérdéshez. Bár biomérnöki tanulmányaim alatt nagyon sok kurzus foglalkozott enzimekkel, de alapvetően mindig a kulcs-zár modell és az indukált-illeszkedés modell került szóba, s először a Richterben dolgozva kutatóként hallottam a CYP enzimekről, annak ellenére, hogy ez már a 1970-es évek óta intenzíven kutatott terület. Egyetemünkön magasabb évfolyamon tanuló B.Sc hallgatókkal beszélgetve is úgy tűnik, hogy nem tanultak még ezekről az enzimekről. Szerintem fontos lenne tanítani róluk, mert egy teljesen más szempontból közelítené meg az ember az enzimek reaktivitását, fontos lenne biomérnököknek tudniuk, hogy léteznek polisubsztrát enzimek is. Ráadásul pl. a tormából származó peroxidáznak nagyon fontos analitikai alkalmazásai is vannak.

A nitrogén-monoxid hem-csoportozóhoz való kötődési energiájának kvantumkémiai vizsgálati módszerének leírása kapcsán szerepel az 52. oldalon "A zéruspont rezgési energia hatása a spinállapotok felhasadására kicsi, míg a NO kötési energiáját várhatóan 1-2 kcal/mol-lal csökkenti." Kérem, adja meg, hogy a zéruspont rezgési energia hatásának idézett becslése min alapszik!

Ezt a kérdést is nagyon szépen köszönöm, Ez egy durva becslése volt a zéruspont rezgési energiának, de a következőképpen értelmezhető. Amikor két fragmens között kötés alakul ki, akkor összességében a rezgések száma nagyobb lesz a két külön fragmens rezgéseinek összegénél. Tegyük fel, hogy összesen eggyel nőne az összes rezgések száma azáltal, hogy kialakul a kötés a NO ligandum és a hemcsoport között, s minden pontosan ugyanolyan maradna, mint a kötés kialakulása előtt (ami nyilván nagyon durva becslés). Akkor ennek a kialakuló egy rezgésnek a hozzájárulása a teljes zéruspont rezgési energiához a következő formulával lenne számítható: $ZPE = 0,5hc\tilde{\nu}$, ahol h a Planck állandó, c a fénysebesség és $\tilde{\nu}$ a hullámszám. A $0,5hc$ értéke $2,27827 \cdot 10^{-6}$ cm Hartree, és feltételezve, hogy a NO molekula és a hemcsoport között kialakuló kötés hullámszáma 100 cm^{-1} , akkor a ZPE $2,27827 \cdot 10^{-4}$ Hartree-nak, vagyis kb 1,4 kcal/molnak adódik.

A kérdés megválaszolása során viszont úgy döntöttem érdemes leellenőrizni ennek a becslésnek a helyességét, és kiszámítottam a imidazolhoz kapcsolódó hemcsoport, a NO molekula és a imidazol-hem-NO komplex zéruspont rezgési energiáját is a B3LYP funkcionállal (az egyensúlyi geometriát is meghatároztam hozzá). A NO molekula rezgéseinek száma lineáris molekula lévén: $3N-5=1$ rezgés, a hemcsoport rezgéseinek száma $(3N-6)=132$ rezgés, míg a hem-NO komplexé 138 rezgés. A szeparált fragmensek zéruspont-rezgési energiájához képest az egyesülési reakcióban 3,6 kcal/molal növekszik a ZPE, vagyis az 1-2 kcal/mol ZPE növekedés alulbecslése a valós ZPE növekedésnek.

A 28. ábrán (59. oldal) mutatott eredmények alapján a P450_{nor}-ban a hidridtranszfer a N-atomra kedvezményezett az O-atommal szemben. Érdekes, hogy a N-atomra történő hidridtranszfer előnyösebbnek (alacsonyabb gát, kisebb endotermicitás) adódott gázfázisban, mint az enzimben, vagyis az enzim nem segíti elő ezt a reakciólépést. Hogyan értelmezzük ezt?

Sajnos másik rendszer esetében is tapasztaltuk azt, hogy a gázfázisban számított gátak alacsonyabbak voltak, mint az enzimben számított gátak. Azt gondolom, hogy ez a QM/MM metodológiánk hiányosságaiból ered. Gázfázisban klaszter modellt alkalmazva semmiféle sztérikus effektus nem befolyásolja a hemcsoport és a ligandum elhelyezkedését, míg ha figyelembe vesszük az aktív centrumot a QM/MM számításoknál akkor sajnos annak csak minimális változását figyeltük meg a számítások során. Nyilvánvalóan a valóságban a fehérje nem merev és követi a reakció lefolyását, ráadásul sok esetben fontos lehet az, hogy a fehérje környezet úgy alakuljon, hogy az elektrosztatikus mező változása is elősegítse a katalízist (pl. megváltozhat az aktív hely polaritása a reakció során azáltal, hogy töltött részecskék képződnek/alakulnak át.).

A mi QM/MM módszerünk hatékonyságát a mikroiterációs eljárás adja és ez kombinálva az adiabatikus térképezéssel sok esetben jól működik, de az is egyértelmű, hogy bizonyos esetekben nem, s azt hiszem ezek közé tartozik a P450_{nor} is. (Most foglalkozunk azzal, hogy tudnánk-e adiabatikus térképezés helyett más módszert alkalmazni, s Neil McFarlane beépíti a Growing String módszert a QM/MM programunkba Leuvenben, amely elvileg nagyobb rugalmasságot kölcsönöz a fehérjeszerkezetnek modellezés során, és remélhetőleg azok a rendszerek is könnyebben vizsgálhatóak lesznek, amelyekre az adiabatikus térképezés nem működött jól). Ebben a reakcióban a hidridion a NADH-ról vándorol át a NO ligandumra, így egyrészt töltésszétválás történik, másrészt valószínűleg nagyobb szerkezeti változások játszódnak le a rendszerben, mint amit a mi QM/MM számításaink találtak, és nem tud kialakulni a mi modellünkben az a kedvező geometriai helyzet, mint a gázfázisú számításainkban. Azt gondolom, hogy ezek az okok rejlenek a QM és QM/MM eredmények eltérése között. Ennek ellenére azt gondolom, hogy az eredmények olyan szempontból egyértelműek, hogy a hidridion mindenképp az NO ligandum nitrogénatomjára vándorol, s nem az oxigénatomra. Mi cikkünkkel hasonló időben megjelent cikk zárthéjú rendszer esetén 9,8-13,2 kcal/mol gátat talált, ami közelebb esik a valóságos gáthoz. ¹⁵

Az IPMDH enzim mechanizmusának vizsgálatában a vad típus és az E270A mutáns számított reakciógátjaival meggyőzően mutatja a K⁺ elektrosztatikus hatásának szerepét a katalízisben. Ugyanakkor a nikotinamid gyűrű számított atomi töltései (11. táblázat, 81. oldal) megítélésem szerint nem járulnak hozzá az elektrosztatika szerepének magyarázatához. A hidridiont fogadó szénatom Mulliken töltéseiben talált különbség nem meggyőző, részben mert a Mulliken töltések az elektrosztatikus tulajdonságokat általában nem jól tükrözik, részben pedig a csekély (0.05 elektron) különbség miatt (amely a táblázatban ellenkező előjelű a szövegben hivatkozottal).

Nagyon szépen köszönöm ezt a megjegyzést, és a figyelmességet. Nagyon jó példa ez arra, s számomra a jövőben is fontos emlékeztető lesz, hogy a következtetéseinket mindenképp az adatok alapján kell levonni és bizonyítani, s nem szabad, hogy az elképzeléseim félrevezessenek. Sajnos teljes mértékben egyetértek a bíráló véleményével. Nagyon szerettem volna azt hinni, hogy töltésekkel alá tudom támasztani az elméletemet, de leellenőriztem az adatokat, s a táblázatban szereplő adat a helyes. Sajnos ez az érték így egyáltalán nincs összhangban a szövegben szereplő magyarázattal, amely egyébként csak az értekezésben szerepelt, a megjelent publikációban nem. Azt gondolom, ha lenne még érdeklődés a kísérletes munkatársak oldaláról a reakció iránt, akkor nagyon szívesen foglalkoznék vele, s talán másfajta töltésekkel könnyebben lehetne bizonyítani az elképzelést, de sajnos jelenleg ez már nem érdekes számukra.

Szeretném még egyszer megköszönni Dr. Ferenczy György úrnak, hogy alaposan átolvasta az értekezésemet, és elgondolkodott rajta. Köszönöm az érdekes kérdéseket, amelyek megválaszolása számomra is tanulságos volt, és remélem, hogy válaszaim kielégítő magyarázattal szolgálnak.

Budapest, 2022.11.20



Oláh Julianna

Hivatkozások:

- (1) Minenkov, Y.; Sharapa, D. I.; Cavallo, L. Application of Semiempirical Methods to Transition Metal Complexes: Fast Results but Hard-to-Predict Accuracy. *J. Chem. Theory Comput.* **2018**, *14* (7), 3428–3439. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b00018>.
- (2) Minenkov, Y.; Singstad, Å.; Occhipinti, G.; Jensen, V. R. The accuracy of DFT-optimized geometries of functional transition metal compounds: a validation study of catalysts for olefin metathesis and other reactions in the homogeneous phase. *Dalt. Trans.* **2012**, *41* (18), 5526. <https://doi.org/10.1039/c2dt12232d>.
- (3) Senftle, T. P.; Hong, S.; Islam, M. M.; Kylasa, S. B.; Zheng, Y.; Shin, Y. K.; Junkermeier, C.; Engel-Herbert, R.; Janik, M. J.; Aktulga, H. M.; Verstraelen, T.; Grama, A.; Van Duin, A. C. T. The ReaxFF reactive force-field: Development, applications and future directions. *npj Comput. Mater.* **2016**, *2* (September 2015). <https://doi.org/10.1038/npjcompumats.2015.11>.
- (4) Shaik, S.; Kumar, D.; de Visser, S. P. A valence bond modeling of trends in hydrogen abstraction barriers and transition states of hydroxylation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (31), 10128–10140. <https://doi.org/10.1021/ja8019615>.
- (5) Usharani, D.; Lai, W.; Li, C.; Chen, H.; Danovich, D.; Shaik, S. A tutorial for understanding chemical reactivity through the valence bond approach. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (14), 4968–4988. <https://doi.org/10.1039/c4cs00043a>.
- (6) Dajnowicz, S.; Ghoreishi, D.; Modugula, K.; Damm, W.; Harder, E. D.; Abel, R.; Wang, L.; Yu, H. S. Advancing Free-Energy Calculations of Metalloenzymes in Drug Discovery via Implementation of LFMM Potentials. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, *16* (11), 6926–6937. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00615>.
- (7) Stepanovic, S.; Lai, R.; Elstner, M.; Gruden, M.; Garcia-Fernandez, P.; Cui, Q. Improvement of d-d interactions in density functional tight binding for transition metal ions with a ligand field model: Assessment of a DFTB3+ U model on nickel

- coordination compounds. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22* (46), 27084–27095. <https://doi.org/10.1039/d0cp04694a>.
- (8) 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>.
- (9) Senn, H. M.; Kästner, J.; Breidung, J.; Thiel, W. Finite-temperature effects in enzymatic reactions-Insights from QM/MM free-energy simulations. *Can. J. Chem.* **2009**, *87* (10), 1322–1337. <https://doi.org/10.1139/V09-092>.
- (10) Ahalawat, N.; Mondal, J. Mapping the Substrate Recognition Pathway in Cytochrome P450. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (50), 17743–17752. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b10840>.
- (11) Tyzack, J. D.; Kirchmair, J. Computational methods and tools to predict cytochrome P450 metabolism for drug discovery. *Chem. Biol. Drug Des.* **2019**, *93* (4), 377–386. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13445>.
- (12) Tian, S.; Djoumbou-Feunang, Y.; Greiner, R.; Wishart, D. S. CypReact: A Software Tool for in Silico Reactant Prediction for Human Cytochrome P450 Enzymes. *J. Chem. Inf. Model.* **2018**, *58* (6), 1282–1291. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00035>.
- (13) Rydberg, P.; Gloriam, D. E.; Zaretski, J.; Breneman, C.; Olsen, L. SMARTCyp: A 2D method for prediction of cytochrome P450-mediated drug metabolism. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1* (3), 96–100. <https://doi.org/10.1021/ml100016x>.
- (14) 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>.
- (15) Riplinger, C.; Neese, F. The reaction mechanism of Cytochrome P450 NO reductase: a detailed quantum mechanics/molecular mechanics study. *Chemphyschem* **2011**, *12* (17), 3192–3203. <https://doi.org/10.1002/cphc.201100523>.