

Válasz Pápai Imre bírálatára

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

A kvantumkémia számításokban használt DFT módszerek tesztelése többször is szóba kerül a dolgozatban, és a kapott eredmények jól rávilágítanak az energia becslések bizonytalanságára. Kissé meglepő számomra, hogy a tanulmányok túlnyomó többségében a B3LYP funkcionált alkalmazták (gyakran diszperzió korrekció nélkül), és a modernebb hibrid meta-GGA funkcionálok (Truhlar vagy HeadGordon féle funkcionálok) nem vagy csak elvétve kerültek alkalmazásra illetve tesztelésre. Mi az oka annak, hogy a B3LYP funkcionál ilyen sokáig népszerű maradt a fémtartalmú enzimek reakcióinak kvantumkémiai tanulmányozásában? Mennyire fontos a diszperziós kölcsönhatások figyelembe vétele az ilyen jellegű tanulmányokban. Megbízhatóbb közelítő funkcionálok fejlesztése napjainkban is aktív kutatási terület. Léteznek olyan friss benchmark tanulmányok átmenetifém rendszerekre melyek segítenek eligazodni pontosabb (de nagyobb rendszerekre is felhasználható) funkcionálok kiválasztásában?

Köszönöm szépen a feltett kérdéseket, mert ezek a felhasznált metodológia nagyon fontos aspektusaira kérdeznak rá. A sűrűségfunkcionál-elmélet jelentős fejlődésen ment keresztül az elmúlt 45 évben, s mára már több, mint 200 féle, különféle közelítéseket tartalmazó funkcionál létezik. Ezeket gyakran „Jákob-létrája” alapján csoportosítják. Elvileg minél magasabb lépcsőfokon helyezkedik el a funkcionál, annál pontosabb és megbízhatóbb eredményeket szolgáltat (és általában nagyobb valamivel a számítási igénye is). Az egyes lépcsőfokok között általában nagyon nagy a pontosságbeli különbség, ugyanakkor egy adott lépcsőfokon belül már általában kisebb. A funkcionálok kiválasztásánál főcsoportbeli elemeket tartalmazó vegyületek esetén nagyon nagy segítséget nyújt Mardirossian és Head-Gordon közel 60 oldalas tanulmánya,¹ amelyben ezek teljesítményét 8 különféle tulajdonság alapján hasonlítják össze. Szinte minden esetben a ω B97 és Minnesota funkcionálcsaládok tagjai teljesítenek a legjobban, ugyanakkor nem ugyanaz a funkcionál, hanem a család különböző tagjai.

Az átmenetifém-komplexek számításkémiai vizsgálata során a korrelációs energia figyelembevétele még fontosabb, mint főcsoportbeli elemek esetén. Ez részben a részlegesen betöltött d alhéjnak, kompakt kétszeresen betöltött d

pályáknak, a közel degenerált $(n+1)s$ és nd alhéjaknak, valamint a fémek és ligandumok között időnként kialakuló viszonylag gyenge kötéseknél is tulajdonítható. Ezek nemcsak az átmenetifém-komplexek alapállapotának szerkezetét és elektroneloszlását befolyásolják, de számos hasonló energiájú állapot létezéséhez is vezethetnek. Azáltal, hogy a DFT funkcionálok viszonylag alacsony számítási szint mellett képesek figyelembe venni valamilyen szinten mind a dinamikus, mind a nem-dinamikus elektronkorrelációt, különösen fontossá váltak az átmenetifém-komplexek modellezésében. Ugyanakkor, ahogy egyre több tanulmány jelent meg, nyilvánvaló váltak a DFT funkcionálok hiányosságai is. 2009-ben Cramer és Truhlar ² összefoglaló tanulmányukban rámutattak arra (többek között), hogy a LYP korrelációs funkcionál igen gyengén írja le a közepestávú korrelációs hatásokat, amelyek fontosak a diszperziós kölcsönhatások jó leírásához is. Azt is megmutatták, hogy olyan rendszerekben, ahol ez kiemelkedően fontos ott az M06 funkcionál sokkal jobban teljesít, mint a B3LYP.

Hamarosan megjelentek, és a fentebbi okok miatt nagyon hamar elterjedtek, a diszperziós kölcsönhatások figyelembe vételére alkalmas empirikus korrekciók, amelyek közül talán a legismertebb a D3.³ Eleinte ez csak egy külön alkalmazás segítségével volt számítható, majd az általunk használt programcsomagokba is beépítésre került, de nem azonnal. Már ebben az évben egyértelmű volt az is, hogy a diszperziós kölcsönhatások figyelembevétele fontos CYP enzim katalizált reakciók vizsgálatánál is.⁴ Ettől kezdve minden munkánkban (kivéve az IPMDH enzimet) mindig figyelembe vettük a diszperziós kölcsönhatásokat a D2 vagy D3 korrekciók segítségével. Sajnálom, ha ez nem derült ki egyértelműen az értekezésből. Posztdoktorként Bristolban végzett számításaink 2010 előtt készültek, csak a publikációk jelentek meg 2011-ben.

Nagyon sok tanulmány és összefoglaló tanulmány foglalkozott és foglalkozik a DFT funkcionálok validálásával, kiválasztásával átmenetifém-komplexek esetén. Pl. Swart és Gruden az OPBE funkcionál kiemelkedő teljesítményét hangsúlyozzák.⁵ Truhlar és társai 14 db vas-tartalmú komplexet vizsgáltak (7db Fe^{2+} , 5db Fe^{3+} és 2db Fe^{4+} iont tartalmazó rendszert) 20 féle funkcionállal, és arra voltak kíváncsiak, melyik képes visszaadni az alapállapot spinállapotát.⁶ A hibrid funkcionálok összességében jobbak voltak, mint a lokális funkcionálok. A def2-TZVP báziskészletet használva a PW6B95 mind a tizennégy komplex alapállapotát helyesen adta vissza, míg a B3LYP, MPW1B95 és MN15 csupán egy komplex esetén tévedett. A lokális funkcionálok közül az OPBE, OLYP és M06-L funkcionálok voltak a legjobbak, amelyek 12 komplex

alapállapotát találták el. Ugyanakkor hozzátesszik: “Azonban, kvantitatívan, a funkcionálok többsége egyáltalán nincs közel a kísérletileg mért spinállapot felhasadási energia értékekhez.”

Miért maradt összességében annyira gyakori a B3LYP funkcionál bioszervetlen kémiai területen? Mielőtt a kérdést megválaszolnám, még egyszer hangsúlyozom, hogy fontos a diszperziós kölcsönhatások figyelembevétele. A legfontosabb okok, ami miatt empirikus diszperzióval korrigálva a B3LYP még mindig népszerű funkcionál, a következők: (1) képes visszaadni a kísérletileg röntgen-diffrakcióval meghatározott szerkezeteket (2) megfelelő leírását adja a hemkomplexek spinállapot felhasadásának (3) kvalitatívan helyes energiaprofilokat szolgáltat összhangban a legpontosabb benchmark számításokkal, amelyet a CCSDT(Q) módszerekkel határoztak meg⁷ (4) nagyon sok esetben hasznosnak bizonyultak CYP enzimek vizsgálatánál^{8,9} (5) más funkcionálok (pl. B3LYP*, B3PW91, M06, OLYP, és TPSSh) kvalitatívan azonos reakcióprofilokat adtak CYP enzim katalízis modellezése során.¹⁰

A dolgozat 3.1. fejezetében bemutatott tanulmányban különböző CYP izoformák Cpd I állapotainak elektronszerkezetét és oxidáló képességét hasonlították össze, és arra a következtetésre jutnak, hogy azok között nincs jelentős különbség, vagyis ez nem lehet meghatározó tényező az izoformák szelektivitását illetően. A tanulmányból ugyanakkor kiderül (1. táblázat), hogy a P450cam enzim esetében a porfingyűrűre és a kén atomra számolt $\rho(\text{por})$ és $\rho(\text{S})$ spinsűrűségek jelentősen eltérnek a többi, emberi izoformákra számolt értékektől. Ennek mi lehet az oka?

A bakteriális és humán enzimformák spinsűrűségének eltérését az axiális ciszteinát-ligandum eltérő hidrogénkötéses viszonyaival magyarázzák.¹¹ A CYP enzimek aminosav sorrendjében a ciszteinát után egy konzervált glicin aminosav található, amely amidcsoportja hidrogénkötést donál a ciszteinát kénatomjának. Ez a kölcsönhatás erősebb a bakteriális enzimben, és kötéstávolságok is rövidebbek kb. 0,1 Å-mel, mint a humán izoformákban. Feltételezhetően ez a kölcsönhatás csökkenti a kén p pályájának energiáját a porfirin a_{2u} szimmetriájú pályájához képest⁸ (megtartva a D_{4h} szimmetriájú porfingyűrű megfelelő pályájának jelölését az irodalmi szokásokkal összhangban), csökkentve ezzel köztük a keveredést is, és ezért más a spinsűrűség-eloszlás a humán és bakteriális formákban.

Az ösztrogének metabolizmusának régiószелеktivitását tárgyaló 3.3. fejezetben három ösztrogénszármazék (ösztroon, equilin és equilenin) 2- és 4-hidroxilációs reakcióinak mechanizmusát vizsgálták. Egyszerű (a fehérje környezetet magába nem foglaló) Cpd I modelleken végzett DFT számítások eredményei (a két hidroxilációs útvonalra számolt aktiválási gátak, és a reaktivitást jellemző Fukui indexek) jó összhangban vannak az enzimkatalizált reakciókra mért 2-OH:4-OH termékarányokkal. A dolgozatban leírtak szerint (44. oldal) a számított és a mért termékarányokból származtatott gátkülönbségekre „nemcsak a trend egyezik meg, hanem szinte kvantitatív egyezést is találunk”. Ugyanakkor a 3. táblázatban szereplő aktiválási energia adatok (mért: -1.3, -0.5 és >0.8 kcal/mol; számolt: 1.4, 1.4 és 4.1 kcal/mol) ezt nem nagyon támasztják alá. Kifejtené, hogy fenti állítást hogyan kell értelmezni?

Köszönöm szépen a Bíráló megjegyzését, s valóban úgy tűnik, hogy a bemutatott értékek nem támasztják alá a kvantitatív egyezést. Szerencsés lett volna több számított értéket bemutatni a dolgozatban, amelyek a publikációban részben megjelentek, részben az ott bemutatott adatokból kiszámíthatóak. Ezeket az 1. táblázatban összegyűjtöttem. Az adatok minden esetben (kivéve pont azt az egyet, amit a dolgozatban bemutattam) teljes mértékben összhangban vannak a kísérletileg megfigyelt trenddel, miszerint a 4-hidroxilációs út aránya az A<B<C sorrendben növekszik, s hogy a C vegyület esetén gyakorlatilag, csak a 4-hidroxilált termék keletkezése várható megfigyelhető mennyiségben. Az is látható, hogy a kísérletekkel való összhangot a diszperzió korrekció figyelembevétele rontja, mivel kifejezetten a 4-hidroxilációs utat preferálja, feltehetően azért, mert abban az állapotban közelebb helyezkedik el egymáshoz a porfirin gyűrű és szteránváz. Ugyanakkor a dokkolási eredmények alapján inkább a sideon-szerű elrendeződés valószínűsíthető a vizsgált enzimek aktívzsebében, talán azokat a számokat érdemesebb megnézni. Kvantitatív vagy szinte kvantitatív egyezés alatt azt értettem, hogy (1) 1 kcal/molon belül van egyezés a két útra mért számított és kísérleti adatokból származtatott aktiválási energia különbségek között (2) továbbá, hogy diszperzió korrekció nélkül a számítások helyesen jósolják meg, hogy az A vegyület esetében a 2-hidroxilált termék a valószínűbb, B esetén nagyon közel esik a várható termék arány, és C vegyület esetén csak a 4-hidroxilált termék keletkezése várható.

1. táblázat Ösztronszarmazékok 2-hidroxilációs útjának relatív aktiválási energiája kcal/molban a 4-hidroxilációs út gátjához képest B3LYP funkcionállal számítva sideon és faceon elrendeződésekben, vagy a mérésekből származtatva.

		sideon			faceon		
	Exp	6-311+G*	6-311+G* + ZPE	6-311+G* +ZPE+D3	6-311+G*	6-311+G* + ZPE	6-311+G* +ZPE+D3
A	-1,28	-0,5	-0,7	1,7	-0,2	-0,4	1,4
B	-0,48	-0,1	-0,2	2,3	0,0	0,0	1,4
C	>0,8	3,9	3,5	5,6	3,5	3,3	4,1

A 4.1. fejezetben a nitrogén-monoxid kötési energiájára vonatkozó tanulmányokkal kapcsolatban az alábbi kérdések merülnek fel: a) Mi lehet az oka annak, hogy a NO-ra kapott kötési entalpia becslések jóval pontatlanabbak, mint a CO és O₂ molekulákra kapott DFT eredmények? (50. oldal, irodalmi eredményekre való hivatkozások); b) A kis modell rendszerekre (Model 1-3) végzett benchmark számítások hibabecslései mennyire ültethetők át nagyobb Fe(porfirin)-NO rendszerekre?; c) Konceptuálisan mennyire megalapozott az az eljárás, hogy a Kohn Sham pályákból felépített determináns hullámfüggvényt használjuk referenciaként a csatolt-klaszter sorfejtésben?

a) Első látásra valóban meglepő megfigyelés, hogy a DFT módszerek sokkal pontatlanabban becsülik meg az NO és a hemcsoport közötti kötődési energiát, mint a CO/O₂ ligandumok kötődését. Sokan vizsgálták ezt a kérdést ezt a kérdést. Azt gondolom, annak megértéséhez, hogy miért nehezebb az NO kötődési energiájának megbecslése két dolgon érdemes elgondolkodni. Az egyik, hogy honnan ered a DFT funkcionálok jó vagy rossz teljesítőképessége, s hogy mennyiben tér el a CO/O₂ és NO kötődése a hemcsoportoz.

Ahogy már az egyik előző kérdés kapcsán említettem, a DFT sok esetben azért alkalmazható sikeresen átmenetifém-komplexek esetén, mert a DFT mind a dinamikus, mint a statikus elektronkorrelációt figyelembe veszi valamennyire. Ez részben hibakioltásból ered. A Coulomb-tagban megjelenő önkölcsönhatási hibát a HF módszerben pontosan kioltja a kicserélődési energia, viszont a DFT módszerben ez nem teljesül pontosan, így van egy maradvány önkölcsönhatási tag, ami időnként nagy hibákhoz vezethet. A hibrid funkcionálokban a HF kicserélődési tag figyelembevétele hasonló hatású, mintha részleges önkölcsönhatási korrekciót

építenénk be a funkcionálba, ami úgy tűnik, hogy gyakran javítja a pontosságot. Harvey szerint a B3LYP funkcionál jó teljesítőképessége onnan is ered, hogy a benchmark készletekben található molekulák elektronszerkezetében mind a statikus és dinamikus elektronkorreláció, mind a maradék önkölcsönhatási hiba nagyjából konstans, ráadásul nagyjából megegyezik.¹² Ezért nagyobb hibák akkor várhatóak, ha vagy az önkölcsönhatási hiba tér el jelentősen az átlagostól, vagy ha megváltozik a dinamikus és statikus elektronkorreláció egyensúlya vagy mértéke.

Ebből a szempontból tekintve az hem-NO komplex elektronszerkezete jelentősen eltér a hem-CO komplexétől. A CO komplex zárthéjú, amit úgy is tekinthetünk, hogy a CO ligandum hat kölcsön a d_6 konfigurációjú Fe^{2+} ionnal tradicionális σ -koordinációs és π -viszonykoordinációs kötésben. Az O_2 már nem minden komplexben viselkedik ártalmatlan ligandumként, viszont a NO egy tipikus nemártalmatlan ligandum. A komplexet kétféle rezonancia szerkezettel is leírhatjuk az $Fe(II)$ -NO szerkezet mellett jelentős a $Fe(I)$ - NO^+ rezonancia szerkezet is. A kialakuló elektronszerkezet leírásának bonyolultságát mutatja, hogy a hem-NO komplex esetén (amelynek alapállapota dublett) a hibrid és tiszta DFT funkcionálok jelentősen eltérő spinsűrűséget adnak a Fe, N és O atomokra. (lásd lentebb a 2. táblázatot.) Valószínűsíthetően a Fe-NO komplexben a nem-dinamikus elektronkorreláció sokkal jelentősebb mint a Fe-CO komplexben, s ez okozza azt, hogy a DFT funkcionálok rosszabbul becsülik meg az NO kötődési energiáját. Itt szeretném még hozzátenni, hogy egy újabb publikációnkban is vizsgáltuk az NO kötődési energiát $Fe(II)$ - hem komplexekhez,¹³ s egyértelmű, hogy a diszperziós kölcsönhatás figyelembe vétele kifejezetten fontos, s ezt nem tudtuk figyelembe venni a 2009-es publikációnkban).

(b) Mennyire ültethető át a kismolekulás modellrendszereken végzett számítások eredménye nagyobb rendszerekre? Azt gondolom, hogy amennyiben a kötésviszonyok nagyon hasonlóak a kis és a nagy rendszerben akkor elfogadható mértékben átültethetőek a következtetések. Úgy próbáltuk meg kiválasztani a ligandumokat a kalibrációs számítások során, hogy a ligandumok töltése, szerkezete és a vasionhoz történő koordinációja a méretből adódó lehetőségeken belül a lehető legjobban hasonlítson a porfiringyűrű koordinációjához. Vagyis a két ligandum (CH_3N_2 vagy a $C_3H_5N_2$) ugyanazzal a töltéssel és kötési geometriával rendelkezik, mint a porfiringyűrű. (A számítások során azt a megkötést alkalmaztuk, hogy a ligandumok összes atomjának ugyanabban a síkban kell maradnia). Ugyanakkor egyikük sem ciklikus, így a konjugáció más a valódi rendszerben. Továbbá a

$C_3H_5N_2c$; ligandum két szempontból is hasonlóbb a valódi rendszerhez: ugyanannyi sp^2 szénatom található a két nitrogénatom között, mint a porfirinyűrűben, és emiatt a ligandum harapási szöge is sokkal hasonlóbb. Feltételezve, hogy a két rész korrelációs energiája nagyjából összeadható (ami nyilván nem teljesül pontosan, hiszen az amidinligandumok és a vas között is vannak kötőelektronpárok), és hogy a funkcionálok helyesen írják le az amidinligandumok szerkezetét és energiáját, valamint a vassal való kölcsönhatásukat, akkor a modellrendszerekre számolt eltérés átvihető a valódi porfirinyűrűt tartalmazó rendszerekre.¹⁴

Nagyon érdekes kérdés, hogy mennyiben megalapozott KS pályák használata a CCSD(T) számításokban. Amennyire visszakövethető, először Harvey és Aschi javasolta ezt a megoldást.¹⁵ Maga a cikk csak röviden érinti ezt a kérdést, de a vitairat tartalmazza a részletesebb okfejtést is.¹⁶ Ennek lényege, hogy a HF pályák gyakran meglehetősen kiegyensúlyozatlanok átmenetifém-tartalmú vegyületek esetén, mert nem veszik figyelembe az elektronkorrelációt. Emellett a pályák minősége korlátozhatja az egyreferenciás módszerek pontosságát is, mint pl. a CCSD. Ugyanakkor a KS pályák az elektronkorrelációt is figyelembe veszik. A fentebbiek alapján jutott eszükbe, hogy KS pályákat használjanak kiindulási hullámfüggvényként CCSD(T) számításokban. Azt is megemlítették, hogy elvileg a CC módszerek helyes eredményt kell adjanak nem HF pályák használata esetén is.

E cikk óta eltelt közel 20 évben nagyszámú tanulmány használt KS pályákat CCSD(T) számításokhoz, de egész mostanáig nem vizsgálták a pályák hatását az eredményekre. Ezért igen érdekes Benedek Zsolt és társainak tanulmánya, amelyben kétatomos molekulák energiáját vizsgálták KS és HF pályák használatával különböző CC módszerekkel és alaposan diszkutálják a felhalmozódott irodalmat is.¹⁷ Felhívják a figyelmet az 1960-ban publikált Thouless-tételre, amely bár eléggé elfeledett, de igen fontos állítást tartalmaz: a CC eredmény gyakorlatilag független a pályakészlettől. Benedek és társai tanulmányának legfontosabb következtetése, hogy a FCI limitben és kellően magas CC szinten nem befolyásolja az eredményeket, hogy KS vagy HF pályákat használunk a számításokhoz. Ugyanakkor azt is bemutatják, hogy nagyobb komplexek esetén, amelyekre csak alacsonyabb szintű számítások elérhetőek (pl. density fitting és frozen core közelítés is szerepel a számításokban), van valamennyi hatása a felhasznált pályakészletnek.

Az utóbbi kapcsán szeretném megmutatni néhány porfirin komplexen végzett számításom eredményét, amelyekre B3PW91 és BP86 számításokból származó KS

pályákat használtam DLPNO-CCSD(T) számításokhoz (számítási szint: ZORA-DLPNO-CCSD(T0)/ZORA-def2-TZVP az Orca4.2.1 programcsomaggal. A sűrűségillesztéshez (Density fitting (RI) a SARC/J kiegészítő báziskészletet használtuk). A számított abszolút energiák nem egyeztek meg a két különböző pályakészletet felhasználó CCSD(T) számításokban, viszont a relatív energiák a legtöbb esetben jó egyezést mutattak (2. táblázat). Ugyanakkor az FePIm-NO komplex relatív energiája jelentősen eltér. Ennek oka szinte biztosan az, hogy a két pályakészlet eltérő, ennek egyik nagyon egyértelmű megnyilvánulása az vason és az axiális NO ligandum N és O atomjain számított spinsűrűség.

A fentiek alapján, s a Thouless-tételt is figyelembe véve azt gondolom megalapozott a KS pályák használata s bizonyos problémák esetén kifejezetten ajánlott lehet.

2. Táblázat Vas-porfirin modellek relatív energiája kcal/molban és a számolt spinsűrűségek ZORA-DLPNO-CCSD(T0)/def2-TZVP szinten számítva BP86 és B3PW91 KS pályákat felhasználva

	pályakészlet	
	BP86 pályákat felhasználva ¹³	B3PW91 pályákat felhasználva (nem publikált)
Fe/N/O spinsűrűség ^a	0,46/0,33/0,20	0,19/0,49/0,31
FePIm kvintett + 2 NO	0	0
FePImNO dublett + NO	-13,3	-9.4
FePNONO szinglett + Im	3,3	2.3
FePNO dublet + IM + NO	5,9	5.8

Im: imidazol P: porfirin NO: nitrogén-monoxid

^a DFT számításból származó adatok

Az 5.1. fejezetben leírtak szerint az izopropil-malát dehidrogenáz (IPMDH) enzim által katalizált oxidációs folyamat modellezésénél a QM/MM számításokhoz az MD szimulációkból választottak különböző kiindulási szerkezeteket (konkrétan hármát), és ezekre egyenként meghatározták az aktiválási gátakat. A leírás szerint ezek a szerkezetek konformációjukban térnek el, de az nem derül ki (számomra még a D10-es cikkből sem), hogy

pontosan miről van szó. Miben különbözik a három szerkezet? Csak az enzimműködésben, az oldalláncok konformációiban, vagy pedig a szubsztrát molekula konformációjában is vannak különbségek? Mennyire önkényes vagy triviális ez a kiválasztás? A számolt energiaprofilokon mindenesetre viszonylag nagy eltérések adódnak, és mindhárom esetben a ketocsoportot tartalmazó köztitermék keletkezése endoterm folyamatnak bizonyul, és így vélhetően a dekarboxilációs lépés adja a teljes folyamat termodinamikai hajtóerejét. Alátámasztható ez számításokkal? Az 5. fejezet végén található összegzésben javaslatot tesznek a teljes katalitikus ciklus mechanizmusára, ami azt sugallja, hogy a dekarboxilezési folyamatra is vannak mechanizmus ismeretek.

Köszönöm szépen ezeket a feltett kérdéseket. Az egyik nagyon fontos kérdés QM/MM számítások során, hogy vajon mennyire reprezentatívak a számított eredményeink. A fehérjék nem merevek, hanem dinamikusan változó sokezer szabadsági fokkal rendelkező rendszerek, amelyek potenciális energia hiperfelületén nagyszámú lokális minimum létezik. Ebből következően a kiindulási és a termékállapotok sokaságait várhatóan nem egy jól körül határolt átmeneti állapot jellemzi, sokkal inkább egy átmeneti állapot sokaság.¹⁸ Fontos kérdés, hogyan nyerhetünk információt ezekről a sokaságokról. Amennyiben a probléma megengedi célszerű olyan QM/MM módszert használni, amivel a rendszer szabadentalpiáját vizsgálhatjuk, pl. esernyő-mintavételezéssel. Ilyenkor a legtöbb esetben valamiféle szempiempirikus módszerrel vizsgálhatjuk a QM régiót. Ugyanakkor átmenetifém-tartalmú rendszerek esetén nem ismerek olyan szempiempirikus módszert, ami megbízhatóan működne, így DFT funkcionálok használatára van szükség. Ezekkel viszont jelenlegi számítási erőforrásaink mellett egyelőre nem tudjuk ezeket a rendszereket vizsgálni, így energiaprofilokra kell támaszkodnunk. Ilyenkor egy kiindulási szerkezetből adott reakciókoordináta mentén határozzuk meg a rendszer energiáját (adiabatikus térképezés). Minden egyes kiindulási szerkezet saját aktiválási energiával és saját mechanisztikus információ tartalommal rendelkezik.

Saját és kollégák, ismerősök tapasztalata is azt mutatja, hogy gyakorlatilag minden esetben függ a QM/MM energiaprofil számítás eredménye a kiindulási szerkezet jóságától. Sok esetben nem látható át emberi szemmel, hogy kiindulási szerkezetek miért és mennyiben különböznek egymástól. Amennyire az MM erőter megengedi, különbözni fognak az aminosavak elhelyezkedésében, akár a szubsztrát konformációjában, kötéstávolságban, hidrogénkötéses tulajdonságokban. Így volt ez az IPMDH esetében is. Szerintem kifejezetten hasznos, ha valamennyire eltérő szerkezeteket választ az ember, hogy nagyobb betekintést nyerhessen a reakcióba és a fehérje hatásába.

Saját tapasztalatom az, hogy érdemes kémiaileg relevánsnak tűnő kiindulási szerkezetet választani, ahol azok az atomok és fragmensek, amelyek konkrétan részt

vesznek a kémiai reakcióban úgy helyezkednek el, hogy a reakció le tudjon játszódni. Rossz kiindulási szerkezet esetén szinte garantálható, hogy nagyon magas aktiválási energia értéket számít az ember. Ez teljesen eltér a QM számításoktól, ahol főleg a minimumok meghatározása (ha nincs nagyon sok belőlük) egyszerűbb, és még rossz kiindulási szerkezet esetén is eljut általában az optimáló algoritmus egy releváns szerkezethez. Ilyen értelemben az IPMDH téma esetén is több kiindulási szerkezetet választottam, amik szemre jónak tűntek. Szeretném hangsúlyozni, hogy ez a területen egy szokásos, és bölcs hozzáállás.¹⁹

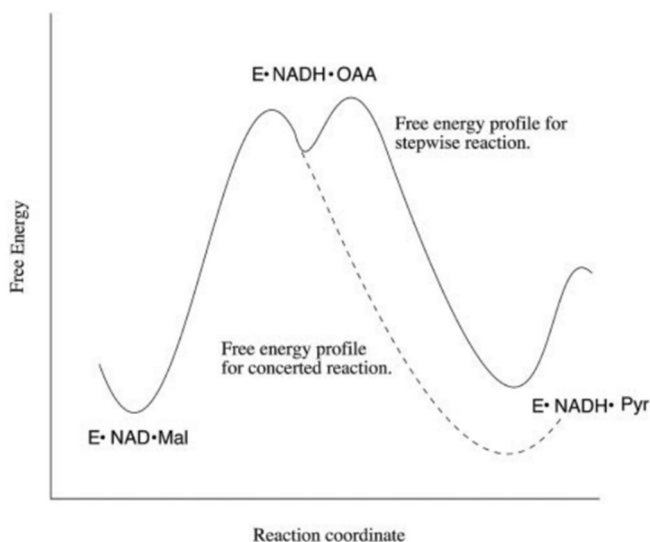
Számomra a számított aktiválási energia különbségek nem tűntek nagynak, sőt nagyon elégedett voltam velük. Ismert olyan tanulmány pl. propén hidroxilációja,²⁰ ahol 8 különböző kiindulási szerkezetre a számított aktiválási energiák 5,0-22,1 kcal/mol között változtak. Nyilván nagyon fontos kérdés, hogy mit kezdünk a számított aktiválási energiákkal? Melyiket fogadjuk el, s miért? Többféle lehetőséget is javasoltak, pl. lehet egyszerűen átlagolni őket, vagy lehet olyat, hogy a legmagasabb értéket kihagyjuk, mondván, hogy valószínűleg az alacsonyabb aktiválási energiájú reakcióutak fognak dominálni. Az utóbbi gondolatmenethez illik az is, hogy lehet pl. a számított gátakat a Boltzmann-eloszlás alapján átlagolni. Mi a munkáinkban jellemzően megadtuk az egyes aktiválási energiákat bemutatótva azt, hogy mekkora tartományon belül változtak.²⁰

Nagyon érdekesnek tartom a Bíráló megjegyzését, hogy várhatóan a reakció termodinamikai hajtóerejét a dekarboxilációs lépés adja. Az igazság az, hogy próbáltam reakcióutakat számítani a dekarboxilációra is, de nem sikerült értelmes eredményekre jutni. Azt hiszem ennek több oka is volt. Valószínűleg a kiindulási szerkezeteim a dekarboxilációs lépés modellezéséhez nem voltak jók. Az általunk használt QM/MM program nem enged jelentősebb relaxációt a rendszerben, s nagyon könnyen lehetséges, hogy már a hidridtranszfer során vagy a köztitermék állapotban a fehérje szerkezet valamiféle relaxáción keresztül megy, ami megkönnyíti a dekarboxilációt, de én ezt nem modelleztem, nem tudtam modellezni, mert a QM/MM energiaprofilok felvétele során nem jelent meg a rendszerben. A másik szintén metodológiai probléma, hogy a dekarboxiláció során a negatív töltésű karboxilátcsoportból egy semleges gázmolekula képződik és ez jelentősen megváltoztatja a QM régió dipólusmomentumát és a valóságban egész biztosan valamiféle fehérje konformációváltozás is elősegíti. Sajnos ezt sem tudja a mi módszerünk visszaadni. Harmadik probléma, hogy a mi módszerünkkel csak energiaváltozást tudunk számítani, viszont egész biztosan jelentős a reakció lejátszódása során az entrópia növekedés is, hiszen egy CO₂ molekula szakad le a szubsztrátból, bár lehetséges, hogy a translációs/rotációs fokok megnövekedéséhez tartozó entrópiikus tag, csak azután válik jelentőssé, hogy a gázmolekula kidiffundál a fehérjéből.

Azt hiszem ennek a lépésnek a vizsgálatára szemiempirikus módszert alkalmazó QM/MM módszerek alkalmasak lehetnének, amelyekkel pl.

esernyőmintavételezéssel követni lehetne a rendszer szabadentalpiájának a változását és a fehérje környezet is jobban követni tudná, s elő tudná segíteni a reakció lejátszódását.

Viszont a bíráló intuíciójával összhangban a malát-dehidrogenáz enzim esetén (ami az IPMDH közeli rokona) ismert a kétlépés reakció szabadentalpia-profilja.²¹ A szabadentalpia-profil úgy határozták meg, hogy a reakciót a köztitermékből indították, s figyelték mennyi kiindulási anyag és mennyi végtermék képződik. A publikációban szereplő 4. ábra szerint a NAD⁺-ra történő hidridtranszfer szabadentalpia-veszteséggel jár, míg a dekarboxiláció szabadentalpia-nyereséggel. Sajnos az ábra rosszul adja vissza, de a cikk szövege szerint a kiindulási anyagok és a végtermékek 1:2,33 arányban képződtek a köztitermékből, s ez alapján vagy a végtermék oldal szabadentalpiájának alacsonyabban kellene lennie, mint a kiindulási anyagokénak, vagy a végtermékek felé kisebbnek kellene lennie a gátnak, vagy mindkettőnek igaznak kellene lennie. Mindenesetre, valóban a dekarboxilációs lépés adja a reakció szabadentalpia-nyereségét.



1. ábra A malát-dehidrogenáz enzim reakciójának szabadentalpia-profilja. Az ábra a ref. 21 hivatkozás 4. ábrájával azonos. A szimulációink szempontjából a folytonos görbe lényeges, amely mutatja, hogy a NAD⁺-ra irányuló hidridtranszfer során képződő köztitermék szabadentalpiája magasabb, mint a kiindulási anyagé vagy a végterméké.

Valóban javaslatot tettünk az enzim reakciómechanizmusára, ennek alapja (1) a meghatározott röntgenszerkezet volt, amelyben a TYR 139-es oldallánc a szubsztrát és a LYS 185' oldallánc közvetlen közelében helyezkedik el (2) kinetikai mérések, amelyek a TYR 139-es oldallánc fontos szerepét jelezték a katalízisben (a TYR139ALA

mutáns aktivitása kb századrésze a vad típusnak) és (3) a malát-dehidrogenáz enzim esetén szintén egy TYR-LYS pár játszik kulcsszerepet a katalízisben.²²

A káliumion szerepét tárgyaló fejezetben (5.2. fejezet) a QM/MM eredmények értelmezésénél (80. oldal) olvasható, hogy az IMPDH enzim vad típusában a hidridiont fogadó C4 szénatom pozitívabb, és így a hidridion felvétele könnyebb, mint a mutáns enzimben. A 11. táblázat utolsó sorában található Mulliken töltés adatok ennek ellenkezőjét mutatják (vad típusban negatívabb a C4 szénatom). Félreérték én itt valamit?

Nagyon szépen köszönöm ezt a megjegyzést, mert tényleg rávilágít arra, hogy a Bíráló gondosan elolvasta az értekezésemet. 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 nem ért semmit félre a bíráló. A táblázatban szereplő érték nincs összhangban a szövegben szereplő magyarázattal, amely egyébként csak az értekezésben szerepelt, a megjelent publikációban nem. Bár a számított érték nincs összhangban a magyarázattal, mégis az az érzésem, hogy a magyarázat helyes, és további számításokkal, pl. másfajta töltések vizsgálatával alá lehetne támasztani az elméletemet. Sajnos mivel a kísérletesek nem foglalkoznak már ezzel a rendszerrel, a molekuláris biokémia fejlődése is túlhaladta a tradicionális enzimológiát, ezért úgy éreztem, hogy most nem érdemes több energiát ebbe a kérdésbe fektetni.

Végül a 6.3. fejezetben bemutatott mikrokinetikai szimulációkkal kapcsolatban a következőket szeretném megkérdezni: Mennyire ad egyértelmű megoldást az az illesztési eljárás amit a kinetikai modell paramétereinek a kísérleti adatokhoz való illesztésénél alkalmaztak? Elegendő kísérleti adat állt rendelkezésre a nagyszámú paraméter illesztéséhez? Mennyire állja meg a helyét az a feltételezés amit az illesztési eljárásban alkalmaztak, miszerint a DFT számított gátak ± 3 kcal/mol hibahatáron belül vannak?

Köszönöm szépen a feltett kérdéseket. Ezeket most nem a felvetésük sorrendjében válaszolom meg. Mielőtt a konkrét kérdésekre válaszolnék, szeretném elmondani, hogy a legelső mikrokinetikai számításainkat paraméter-illesztés nélkül végeztük el, s ezekben a szimulációkban egyáltalán nem jelent meg az autokatalitikus HER ciklus. Ennek legfontosabb oka az, hogy a vizsgált DFT funkcionálok közül egyik sem képes jól megadni a $\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2$ és $\text{SiP}_3\text{Fe-H}_2$

komplexek stabilitásának arányát, mindegyikük a kísérleti adatokhoz képest túlságosan stabilnak mutatja az Fe-N₂ komplexet az Fe-H₂ komplexhez képest. Ha a komplexek relatív stabilitása nem megfelelő nyilvánvalóan a gátmagasság sem lesz megfelelő. Ezért mindenképp szükségünk volt paraméter-illesztésre.

Ahhoz, hogy képünk legyen a DFT funkcionálok pontosságáról a H₂ és N₂ komplexek kötődésének pontosságáról újabb számításokat végeztünk a kísérletileg ismert 4 rendszer egyensúlyi állandójához kapcsolódóan. Az eredmények a 3. táblázatban láthatóak. Még a legjobbnak mutatkozó ω B97X-D3 funkcionál átlagos hibája is 4 kcal/mol körül volt.

A fenti táblázat adatait tekintve nem állja meg helyét teljes mértékben az az állítás, hogy a DFT hiba 3 kcal/molon belül van, hiszen egy kritikus egyensúlyi állandó esetén tudtuk, hogy a mért értékhez képest 8 kcal/molal is eltér a számított szabadentalpia-érték (s ha reakció szabadentalpia-változása ennyivel eltér, akkor a gátmagasságok is eltérhetnek ennyivel), ugyanakkor azért a gyakorlatban szokták a DFT hibáját ± 3 kcal/molként becsülni. A fentebb említett Martin Head-Gordon és társai által készített benchmark tanulmány¹ is azt mutatta, hogy a különböző benchmark adatkészletek esetén az ω B97XD funkcionál különösen megbízható, az átlagos RMSD értékek szinte mindig 3 kcal/mol alatt voltak, kivéve a TCD adatkészletet (Bond Dissociation Energies, kötés disszociációs energia) ahol 6 kcal/mol alatt van az átlagos hiba, amit a publikáció 17. ábrája mutat. Ezért is követtük azt a logikát, hogy paraméter-illesztés során szisztematikusan növeltük a megengedett hibahatárt, és már ± 3 kcal/molnál nagyon jó egyezést értünk el a kísérleti adatokkal.

Valóban igaz az, hogy a modellünk nagyon sok illesztett paramétert tartalmaz. Az is igaz, mint minden illesztési problémánál, hogy annál megbízhatóbbak eredményeket kaphatunk, minél több kísérleti adatpont áll rendelkezésünkre. Sajnos a mi esetünkben a paraméterillesztés során összesen 7 független kísérleti adatpontot tudtunk felhasználni: 5 darab H₂-mennyiség-idő adatképet és 2 darab végső átviteli számot.²³

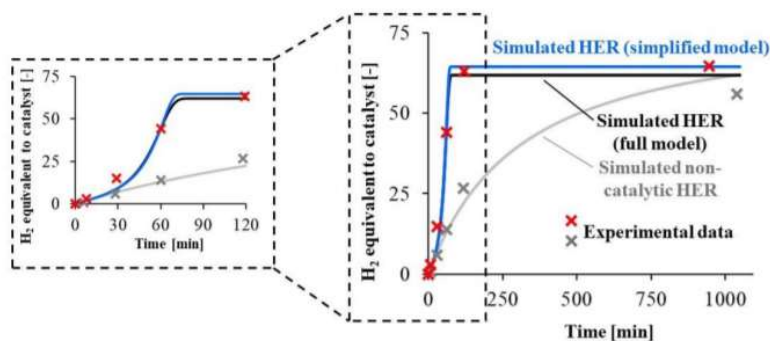
Ezért ahhoz, hogy meggyőződjünk arról, hogy mennyire robosztus a modellünk, és csökkentsük az illesztett paraméterek számát készítettünk egy kisebb kinetikai modellt. Ebben az N₂RR ciklus részben az első tíz lépését egyetlen lépésként építettük be a modellbe ($\text{SiP}_3\text{Fe-N}_2^- + 6 \text{H}^+ + 4 \text{e}^- \rightarrow \text{SiP}_3\text{Fe-NH}_3^+$). Az így kapott eredmények jó összhangot mutattak a sok lépéses mikrokinetikai modellel, ahogy az 2. Ábra is mutatja.

3. Táblázat Kísérletileg vizsgált H₂ és N₂ kötőköötődési reakciók mért egyensúlyi állandói és ezekből származtatható szabadentalpia-változások, valamint különböző funkcionálokkal (ZORA-Funkcionál.-D3(BJ)-CPCM(THF) / ZORA-def2-TZVP szinten számított szabadentalpia értékek, valamint a kísérletekhez számított átlagos hiba. Minden szabadentalpia érték kcal/molban van megadva.

Funkcionál Egyensúly	$\Delta G_{\text{calc}} - \Delta G_{\text{exp}}$					Kísérlet	
	B3LYP	TPSSH	ω B97X-D3 ^a	M06L	SCAN	K _{exp}	ΔG_{exp}
SiP ₃ Fe-N ₂ + H ₂ \rightleftharpoons SiP ₃ Fe-H ₂ + N ₂ ^b	17,8	19,4	8,7 ^c	16,5	21,0	50	2,3 -
SiP ₃ Fe ⁺ + N ₂ \rightleftharpoons SiP ₃ Fe-N ₂ ⁺	-2,7	-5,5	3,5	-4,1	-7,9	1700	4,4 -
SiP ₃ Fe ⁺ + H ₂ \rightleftharpoons SiP ₃ Fe-H ₂ ⁺	5,3	4,3	3,8	4,3	3,2	1500	4,3 -
SiP ₃ Fe-N ₂ ⁺ + H ₂ \rightleftharpoons SiP ₃ Fe-H ₂ ⁺ + N ₂	8,0	9,8	0,4	8,5	11,1	0,90	0,1
Átlagos abszolút hiba a kísérleti adathoz képest	8,5	9,8	4,1	8,4	10,8		

^a . ω B97X-D3 esetén nem alkalmaztunk külön D3(BJ) korrekciót

^b az oldószer benzol volt a kísérletben s a számításban is; Erre a reakcióra számított szabadentalpiaváltozások igen jelentősen eltérnek a kísérleti adattól. Ezt a azzal magyaráztuk, hogy ez a reakció két elemi lépést (N₂-leválást és H₂-kötődést) - foglal magában, valamint hogy az SiP₃Fe-H₂ komplexben a H₂ ligandum alagúteffektus révén folyamatosan változtatja benne az orientációját, amelyből eredő entrópiatöbbletet a kvantumkémiai számítás nem veszi figyelembe.



2. ábra A fejlődő hidrogéngáz mennyisége az idő függvényében kísérletekből (keresztekkel jelöl adatpontok) és szimulációkból. Az ábra a 24. referencia Supporting Információjában szerepel.

Szeretném még egyszer megköszönni Dr. Pápai Imre 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

Oláh Julianna

Hivatkozások:

- (1) Mardirossian, N.; Head-Gordon, M. Thirty years of density functional theory in computational chemistry: An overview and extensive assessment of 200 density functionals. *Mol. Phys.* **2017**, *115* (19), 2315–2372. <https://doi.org/10.1080/00268976.2017.1333644>.
- (2) Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Density functional theory for transition metals and transition metal chemistry. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (46), 10757–10816. <https://doi.org/10.1039/b907148b>.
- (3) 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>.
- (4) Lonsdale, R.; Harvey, J. N.; Mulholland, A. J. Inclusion of dispersion effects significantly improves accuracy of calculated reaction barriers for cytochrome P450 catalyzed reactions. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1* (21), 3232–3237.

- <https://doi.org/10.1021/jz101279n>.
- (5) Swart, M.; Gruden, M. Spinning around in Transition-Metal Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49* (12), 2690–2697. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00271>.
 - (6) Verma, P.; Varga, Z.; Klein, J. E. M. N.; Cramer, C. J.; Que, L.; Truhlar, D. G. Assessment of electronic structure methods for the determination of the ground spin states of Fe(II), Fe(III) and Fe(IV) complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (20), 13049–13069. <https://doi.org/10.1039/c7cp01263b>.
 - (7) Altun, A.; Breidung, J.; Neese, F.; Thiel, W. Correlated ab initio and density functional studies on H₂ activation by FeO⁺. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10* (9), 3807–3820. <https://doi.org/10.1021/ct500522d>.
 - (8) Shaik, S.; Kumar, D.; de Visser, S. P.; Altun, A.; Thiel, W. *Theoretical perspective on the structure and mechanism of cytochrome P450 enzymes.*; **2005**; Köt. 105. <https://doi.org/10.1021/cr030722j>.
 - (9) 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.
 - (10) Ma, G.; Yu, H.; Xu, T.; Wei, X.; Chen, J.; Lin, H.; Schüürmann, G. Computational Insight into the Activation Mechanism of Carcinogenic N'-Nitrosoornicotine (NNN) Catalyzed by Cytochrome P450. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52* (20), 11838–11847. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02795>.
 - (11) Christine M. Bathelt; Jolanta Zurek; Adrian J. Mulholland, and; Harvey, J. N. Electronic Structure of Compound I in Human Isoforms of Cytochrome P450 from QM/MM Modeling. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (37), 12900–12908. <https://doi.org/10.1021/JA0520924>.
 - (12) 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>.
 - (13) Rozza, A. M.; Papp, M.; McFarlane, N. R.; Harvey, J. N.; Oláh, J. The Mechanism of Biochemical NO-Sensing: Insights from Computational Chemistry. *Chem. - A Eur. J.* **2022**, *28* (49). <https://doi.org/10.1002/chem.202200930>.
 - (14) 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>.
 - (15) 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>.
 - (16) Gagliardi; Ziegler; Neville-Smith; Garner; Green; Harvey; Eisenstein; Bursten; Kaltsoyannis; Macgregor; Perutz; Hay; Price; Frenking; Siegbahn; Deeth; Meuwly; Bridgeman. General Discussion. *Faraday Discuss.* **2003**, *124*, 145–153. <https://doi.org/10.1039/b306456p>.
 - (17) Benedek, Z.; Tímár, P.; Szilvási, T.; Barcza, G. Sensitivity of Coupled Cluster

- Electronic Properties on the Reference Determinant: Can Kohn-Sham Orbitals Be More Beneficial than Hartree-Fock Orbitals? **2021**, Sz. March, 2103–2120. <https://doi.org/10.1002/jcc.26996>.
- (18) Ma, B.; Kumar, S.; Tsai, C. J.; Hu, Z.; Nussinov, R. Transition-state ensemble in enzyme catalysis: Possibility, reality, or necessity? *J. Theor. Biol.* **2000**, *203* (4), 383–397. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2000.1097>.
- (19) 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>.
- (20) Lonsdale, R.; Harvey, J. N.; Mulholland, A. J. Compound I reactivity defines alkene oxidation selectivity in cytochrome p450cam. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (2), 1156–1162. <https://doi.org/10.1021/jp910127j>.
- (21) Rishavy, M. a; Yang, Z.; Tong, L.; Cleland, W. W. Determination of the mechanism of human malic enzyme with natural and alternate dinucleotides by isotope effects. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *396* (1), 43–48. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2598>.
- (22) 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>.
- (23) Del Castillo, T. J.; Thompson, N. B.; Peters, J. C. A Synthetic Single-Site Fe Nitrogenase: High Turnover, Freeze-Quench ^{57}Fe Mössbauer Data, and a Hydride Resting State. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (16), 5341–5350. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b01706>.
- (24) 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>.