

Válasz Stirling András bírálataira

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

A disszertáció röviden érinti a kérdést, hogy a kísérleti mérésekkel való összevetésnél a megfelelő termodinamikai potenciálfüggvény (pl. állandó T és p esetén szabadentalpia) használata szükséges, de nehéz ezt a mennyiséget az alkalmazott modellek esetén megkapni, ezért "energiaprofilokat" használnak. Mit ért energiaprofil alatt (Kohn-Sham energiákat? esetleg azok valamilyen korrigált értékét? belső energiát? stb.), és milyen kritériumok alapján állítja, hogy az ilyen energiaszámítások alapján kapott kép megfelel a kísérleti körülményeknek megfelelő potenciálfüggvény használatával kapható képnek? Mennyire befolyásolja ez a stratégia az eredmények értékelését ott, ahol néhány kcal/mól energiakülönbséget vizsgálnak (pl. szelektivitási kérdések)? Hogyan állapítják meg a referenciapontként szolgáló nyugalmi állapot (resting state) energiaszintjét (pl. enolizációs gátak esetén)?

Köszönöm szépen a feltett kérdés, amely szorosan kapcsolódik Dr Ferenczy György egyik kérdéséhez. Energiaprofil alatt a munkánkban egy adott reakciókoordináta mentén diszkrét pontokban számított QM/MM energiaértékek összességét értettem a reakciókoordináta függvényében, amelyet általában a reakció kezdőpontjaként azonosított szerkezet QM/MM energiájához hasonlítottunk. Az általunk használt QM/MM megközelítés elektrosztatikus beágyazást tartalmaz, vagyis az MM régió atomjait ponttöltésekkel reprezentáljuk a kvantumkémiai részsámítás során. A QM/MM energia három tagból tevődik össze: a QM régióra számított QM energia, az MM régióra számított MM energia összegéből, valamint ehhez adódik hozzá a QM/MM csatolási tag, amely a QM/MM határfelületen keresztülnyúló kötött és nem-kötött energiatagokat tartalmazza. Az általunk használt programban a QM régió polarizációja az MM régió által a QM energiában jelenik meg, míg a többi csatolási tag az MM energia részeként. Mi mindig sűrűségfüggvény-elmélet segítségével vizsgáltuk a QM régiót, így a QM energiatag valóban KS energiának felel meg.

A második kérdés: miszerint *"milyen kritériumok alapján állítja, hogy az ilyen energiaszámítások alapján kapott kép megfelel a kísérleti körülményeknek megfelelő potenciálfüggvény használatával kapható képnek"*. A kémiai reakciók kinetikáját és termodinamikáját is a reakciók szabadentalpia-változása határozza meg, amelyet a rendszer energiája és entrópiája is befolyásol. Enzimreakciók szabadentalpia-változása számos tagból tevődik össze: befolyásolja az enzim és a ligandum(ok)/termékek solvatációja és annak változása a reakció során, a ligandumok megkötése és a termékek elengedése, s természetesen magának a kémiai reakciónak is van szabadentalpia-változása. Újabban vizsgálták P450 enzimekben μ s

hosszúságú MD szimulációkkal szubsztrátok vándorlását és a szubsztrát megkötésének szabadentalpia-profilját, de ez messze nem rutin eljárás.¹

Gázfázisú reakciók szabadentalpia-változásának megbecslése kvantumkémiai programok segítségével viszonylag könnyen megoldható, az RRHO (rigid rotor harmonic oscillator) megközelítés segítségével, amely feltételezi, hogy (1) az egész rendszer merev testként forog (2) minden intramolekuláris mozgás harmonikus rezgésként kezelhető. Ugyanakkor nagy, biomolekuláris rendszerek esetén az RRHO megközelítés számos okból nehézségekbe ütközik: (1) A több ezer atomból álló rendszerek esetén nagyon drága vagy gyakorlatilag kivitelezhetetlen a teljes rezgési analízis (2) sok, anharmonikus szabadsági fokkal rendelkeznek a szolvatált biomolekulák, amelyekre a harmonikus közelítés nem jogos, (3) az RRHO megközelítés stacionárius pontban alkalmazható (minimum vagy átmeneti állapot) amelyet energiainimalizáló algoritmusokkal határozhatunk meg. Nagy rendszerek esetén azonban sok, hasonló energiájú szerkezet létezik, s egyre sem foghatjuk rá, hogy ez "a" reprezentatív szerkezet.

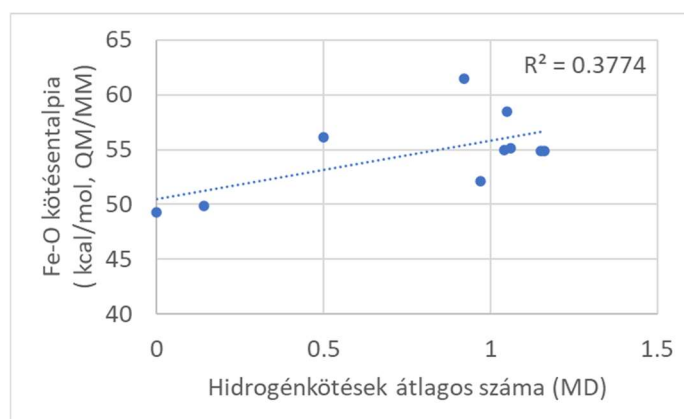
Éppen ezért biomolekulák esetén olyan mintavételező módszereket érdemes használni, amelyet képesek felderíteni a rendszer konfigurációs terét legalábbis lokálisan. Ehhez használják gyakran az esernyő-mintavételezést vagy pl. szabadenergia-perturbációt. Ezek a módszerek nagyszámú energiaszámítást igényelnek, s könnyen alkalmazhatóak molekulamechanikai erőtereket alkalmazva, vagy olyan QM/MM számításokban, ahol a QM régiót szemempirikus módszerrel írjuk le. Sajnos hemfehérjék esetén egyelőre nincs még olyan szemempirikus módszer, ami megfelelő pontossággal alkalmazható lenne, és ezért szükséges a DFT funkcionálok alkalmazása. Egy 2009-es tanulmányban vizsgálták,² hogy mekkora az entrópiikus tag szerepe a P450cam enzimben a kámfor hidroxilációja esetén. Azt találták, hogy gázfázisú modellekben ez a tag nagyon jelentős (-43 kJ/mol), ami az enzimben 2 kJ/molra csökken. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy, amennyiben lokális változásokat vizsgálnak, mint pl. a hidrogén-absztrakció P450cam-ban, akkor a reakciók QM/MM módszerrel számított energiaváltozása és szabadentalpia-változása között a különbség kicsi. Nyilvánvalóan nagyon jó lenne, ha minden CYP-katalizált reakció esetén szabadentalpia-profilokat tudnánk meghatározni, de sajnos ez jelenleg még nehézségekbe ütközik. A fentebbi eredmény alapján azt gondolom, fontos következtetések vonhatóak le a reakciókról energiakülönbségek alapján is, s ez magyarázza azt, hogy nagyon sok P450 reakció során érdemben tudták a szelektivitási kérdéseket vizsgálni.^{3,4} Ha nem így lett volna, nem tudott volna a módszer jelentős mértékben elterjedni.

Felmerült a kérdés, hogy hogyan határoztuk meg a referencia pontként szolgáló nyugalmi állapotot. A reakcióprofilok meghatározásakor nagyon gyakori, hogy a reakciókoordináta mentén előre és hátra haladva, iterálva, több energiaprofil

meghatározunk, s ezt addig folytatjuk, amíg sima, törésmentes és konzisztens reakcióprofilokhoz jutunk. A törések, ugrások egyértelműen arra utalnak, hogy az MM régióban valamiféle átrendeződés történik (bizonyos esetekben egyébként arra is utalhatnak, hogy pl. a QM régió elektronszerkezete jelentősen megváltozik, pl. egy újabb munkánkban megfigyeltük a reakció során, hogy nyílt héjú szinglett állapot zárthéjú szinglett állapottá alakult).⁵ Mi a reakció mindkét végpontját azután határoztuk meg, hogy meghatároztuk a sima reakcióprofilokat, s a reakciókoordináta kiindulási és végpontjában vagy teljesen ellaposodott a görbe vagy újra elkezdett emelkedni az energia. A minimális energiával rendelkező szerkezeten újabb QM/MM geometriaoptimalást hajtottunk végre, amelyben semmiféle megkötést sem alkalmaztunk.

A 31. oldalon a disszertáció a ferril-oxigénen számolt spínsűrűség és a Fe-O kötés erőssége közti trendet elemzi, és ez az elemzés a disztális zsebben lévő vízmolekulákkal kialakuló Hkötéseken alapszik. Érdekes módon a H-kötések átlagos száma nagyon gyengén korrelál a Fe-O kötéserősséggel, ha egyáltalán korrelál. Ezt hogyan lehet magyarázni?

Köszönöm szépen ezt a kérdést, ami teljesen releváns, mi ezt a korrelációt akkor így nem vizsgáltuk meg. A cikk eredményei alapján készítettem az alábbi ábrát (1. ábra), amiben a két mennyiség kapcsolatát vizsgálom. Valóban, teljes összhangban a bíráló véleményével a korreláció nagyon gyenge. Érdekes azon elgondolkodni, hogy miért ilyen gyenge a korreláció, és fenntartható-e az állításunk, hogy a ferril oxigénhez történő hidrogénkötés növelni fogja az Fe-O kötésentalpiát (és ezáltal csökkenteni a Cpd I oxidálóképességét). Az ábrából az azonban mindenképp leolvasható, hogy sok rendszer esetében (az apo formák, a CYP 2C9 azon formája ahol a szubsztrát messze helyezkedik el hemcsoporttól, valamint a P450cam, amelyben nagyon kicsi a ligandum és nem szorítja ki a vizet az aktív zsebből), a hidrogénkötések átlagos száma 1 körüli, s a kötésenergiák átlaga kb 56 kcal/mol. A görbe másik végén, ahol gyakorlatilag nincs víz az aktív zsebben, és az átlagos kötésszám nagyon kicsi, az átlagos Fe-O kötési energia 50 kcal/mol alatt van, ami kvalitatívan összhangban van a következtetéseinkkel. Egy esetben az átlagos hidrogénkötés szám 0,5 körül van, ami annyit jelent, hogy az idő felében van hidrogénkötés, az idő felében pedig nincs.



1. ábra 4 féle CYP izoforma apo- és szubsztrátkötött formájára számított Fe-O kötésentalpiaértékek (QM/MM számításokból), és az MD szimulációkból származtatott átlagos hidrogénkötés számok kapcsolata. Az adatok a ref. 6-ból származnak.

Azt gondolom, hogy a nagyon gyenge korreláció abból ered, hogy teljesen más eredetű módszerekkel és teljesen más sokaságon számítottuk az ábra két tengelyén szereplő adatokat, s így nem összevethetőek. A hidrogénkötések átlagos száma MD szimulációkból származik, amelyet a következő kritériummal határoztunk meg: hidrogénkötés létezik az A-H-D atomok között, ha az A és D atomok közti távolság kisebb, mint 2,8 Å és az AHD kötésszög nagyobb, mint 90°. Ez a fajta definíciója a hidrogénkötésnek gyakorlatilag kategorizálás: vagy van kötés vagy nincs, s egyáltalán nem veszi figyelembe a kötés erősségét. Itt az átlagolás gyakorlatilag nagyon nagy számú szerkezetre történt, amelyben a hidrogénkötések diszkrét eloszlást mutattak, nem folytonos tulajdonságot átlagoltunk. Ehhez kapcsolódik, amit fentebb írtam, hogy a 0,5-ös átlagos hidrogénkötés szám arra utal, hogy az idő felében van, az időfelében nincs hidrogénkötés a Compound I oxigénjéhez.

Ezzel szemben a Fe-O kötésentalpia összesen 20 szerkezetre lett meghatározva QM/MM módszerrel, s ezek az értékek lettek átlagolva. A számított QM/MM energiák adott minimális energiájú szerkezetből származnak, ahol az optimáló algoritmus meghatározta minden egyes atom pozícióját, hogy a legalacsonyabb energiájú szerkezethez jussunk, ebbe beletartozik a ferril-oxigén és a vízmolekulák között kialakuló hidrogénhíd szerkezete is. Várható, hogy, ha létezik hidrogénhíd, akkor ez viszonylag "optimális" szerkezetet eredményez, nyilván figyelembe véve, hogy a vízmolekula akár a fehérje más oldalláncaival vagy további vízmolekulákkal is kölcsönhathat), és az Fe-O kötésentalpia is folytonos skálán változhat, szemben az MD trajektóriában adott szerkezetre számított hidrogénkötés számmal.

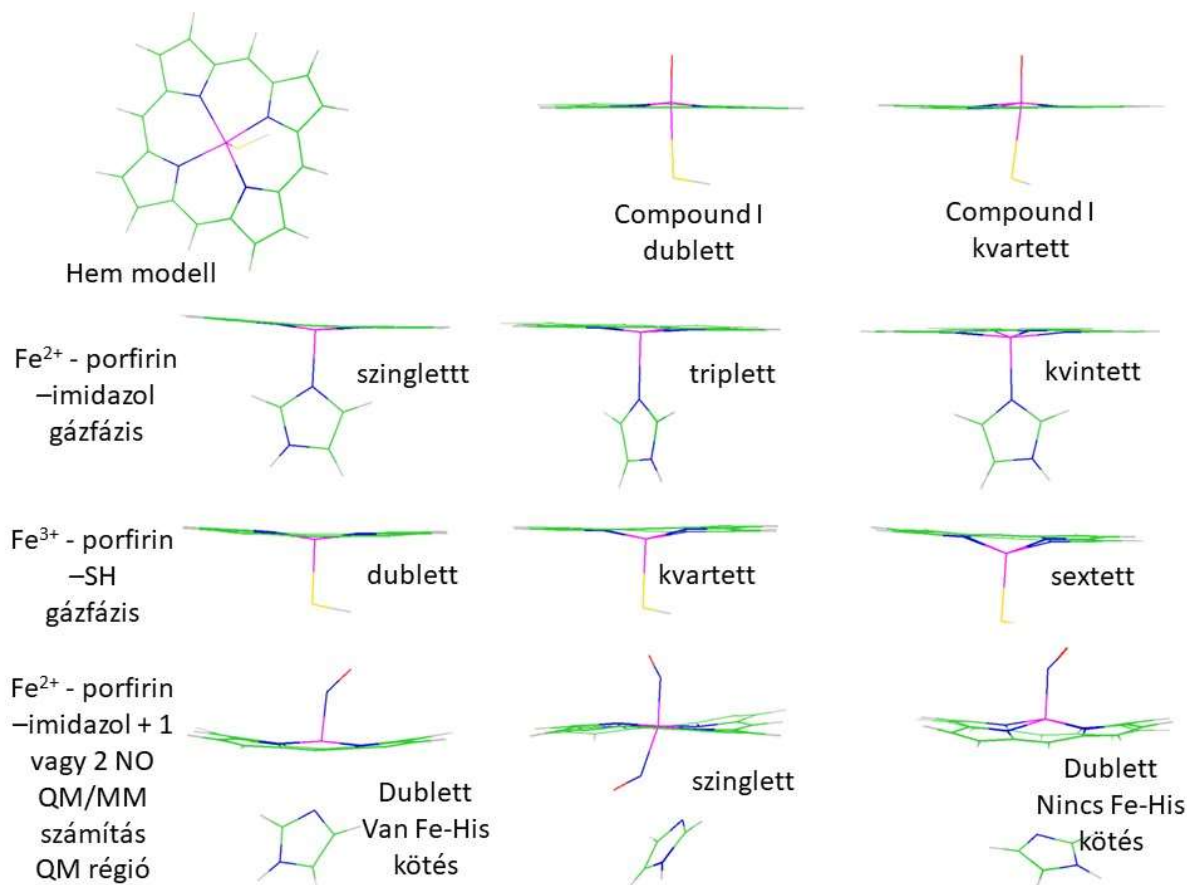
Azt gondolom, hogy az, hogy nem találtunk korrelációt a két érték között végső soron abból ered, hogy más a két változó természete, és teljesen más sokaságra számítottuk ki őket és semmi nem garantálta, hogy egyforma az eloszlásuk. Azt, hogy hogyan befolyásolja a ferril oxigénhez történő hidrogénkötés az Fe-O kötésentalpiát tovább lehetne QM számítások segítségével vizsgálni (pl. gondosan meg lehetne

különböző szerkezeteket vizsgálni 0, 1, 2 vízmolekulát figyelembe véve különböző elrendezésekben), vagy ha nagyon sok erőforrásunk van, pl. QM/MM MD segítségével.

A vas-kofaktort tartalmazó rendszerek esetén a vas-ionnak a porfirin síkból való kimozdulásának mértéke a spinállapot indikátora. Volt-e valamilyen megfigyelésük ilyen mozgásokkal kapcsolatban? Szeretném, ha idekapcsolódóan azt is kifejtené, hogy a 3. fejezet 27. oldal alján említett gyenge csatolás (átfedés) a porfirinyűrű pályáival hogyan eredményezi azt, hogy a Cpd 1 kvartett és dublett állapota között az energiakülönbség igen alacsony (ahogy írja: kevesebb, mint 1 kcal/mól).

Valóban nagyon hosszú ideig azt tartották (főleg a mioglobin ismert deoxi és oxo-szerkezetei alapján), hogy a központi vasion síkból való kitérése a spinállapot indikátora. Eleinte ezt azzal magyarázták, hogy a vasion mérete kvintett állapotban nagyobb, s emiatt mozdul ki a gyűrű síkjából. Ugyanakkor újabb, Fe^{2+} iont tartalmazó hemmodelleken végzett számítások cáfolják ezt a magyarázatot.⁷ QTAIM (Quantum Theory of Atoms in Molecules) számítások szerint éppenséggel kisebb a kvintett állapotban a vasion térfogata, mint a triplett vagy szinglett állapotban. Ezen túlmenően a kötéskritikus pontban számított elektronsűrűség arra utal, hogy a kvintett állapotban erősebb a kötés a vasion és a hemcsoport nitrogénjei között, mint a triplett állapotban a síkból való kimozdulás és hosszabb kötéshosszak ellenére. Egyértelműen azt állítják, hogy a síkból való kimozdulás az axiális ligandummal történő kölcsönhatás eredménye.

Az én megfigyeléseim is összhangban vannak a fentebbi állításokkal. A 2. ábrán összegyűjtöttem pár reprezentatív Fe^{2+} , Fe^{3+} s Fe^{4+} ionokat tartalmazó hemszerkezetet (QM és QM/MM számításokból) és a következők figyelhetőek meg. A Compound I-ban (Fe^{4+}) alig mozdul ki a vasion a porfirinyűrű síkjából spinállapottól függetlenül. Kimozdulás az ötöskoordinációjú vasionot tartalmazó rendszerekben van, ezekben az esetekben valóban növekszik az állapot multiplicitásával, s nagyobb a Fe^{3+} iont tartalmazó rendszerekben, mint a Fe^{2+} -t tartalmazó rendszerekben. A gázfázisú számításokban a porfirin gyűrű gyakorlatilag sík. Ezzel szemben a *Shewanella oneidensis* (So) H-NOX) fehérjéjén QM/MM módszerrel végzett számítások⁵ azt mutatják, hogy a hemgyűrű szerkezete könnyen eltorzul, de a „síkból” való kimozdulás itt is leginkább az ötöskoordinációjú szerkezetben (jobb alsó kicsi ábra) figyelhető meg.



2. ábra Különböző hemmodellek szerkezete. A Fe²⁺ - porfirin-imidazol szerkezeten végzett QM/MM számítások a 5. referenciával jelölt publikációban kerültek bemutatásra.

A kérdés második fele arra vonatkozott, hogy hogyan magyarázható a Compound I dublett és kvartett állapotainak nagyon kicsi energiakülönbsége a Fe-O és porfirin alapú pályák közötti gyenge csatolással. Sok munka vizsgálta a Compound I szerkezetének alapállapotát és alacsony energiájú gerjesztett állapotait,⁸⁻¹¹ s mára rutin eljárás, hogy a vizsgált reakciókat mindkét spinállapotban modellezik, mert létezhetnek közöttük mechanisztikus különbségek.¹² Ahogy az értekezésben említettem, három párosítatlan elektron található a Compound I-ben, amelyek közül két elektron az Fe-O alapú lazítópályákon, egy pedig egy olyan pályán, amelyben a porfirin gyűrű a_{2u} (megtartva az irodalomban szokásos jelölést, amely a D_{4h} szimmetriájú anyavegyület megfelelő pályájának jelölésén alapul) szimmetriájú pályájának és a kénatom nemkötő elektronpárjának hozzájárulása jelentős.

A gyenge csatolás a két pályakészlet (Fe-O vs porfirin+S) között a gyenge vagy elhanyagolható kicserélődési kölcsönhatásra utal. A kicserélődési kölcsönhatás (1) csak azonos spinnel rendelkező elektronok között lép fel (2) általában nagyon rövid hatótávolságú, s olyan elektronok között létezik, amelyek azonos vagy szomszédos

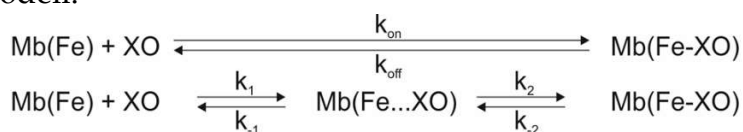
atomokon centrált pályákon helyezkednek el. Ebben az értelemben a kicserélődési kölcsönhatás nagyon erős a két Fe-O pályán elhelyezkedő elektron között, így ezek ferromágnesesen csatolódnak és azonos spinnel rendelkeznek. Ugyanakkor a térbeli elrendeződés miatt az Fe-O pályákon található elektronok és a porfirinalapú pályán található elektronok között akkor is kicsi a kicserélődési kölcsönhatás, ha azonos spinnel rendelkeznek. Ebből következően a rendszer teljes energiáját nem befolyásolja jelentősen, hogy a két pályakészlet hogyan csatolódik egymással, amely eredményeként az energiakülönbség nagyon kicsi a ferromágnesesen csatolt kvartett és az antiferromágnesesen csatolt dublett állapotok között.

Az irodalomban található tanulmányok szinte kizárólag a B3LYP funkcionált használták, s ezért teszt számítások segítségével megvizsgáltam, hogy más funkcionálok milyen eredményeket adnak. A kvartett állapot energiája a dubletthez képest a következőknek adódott kcal/molban (def2-TZVP báziskészletet alkalmazva): B3LYP: 0,20, M06-2X: 0,71, wB97X-D:0,03 és BP86: 2,87, ami összhangban van az irodalomban is megfigyeltekkel, hogy a dublett és kvartett állapotok közti energiakülönbség kicsi. A BP86 funkcionál ismerten a kisebb spinű állapotokat stabilizálja, így nem meglepő, hogy a többi funkcionálnál kissé nagyobb energiakülönbséget jósol.

A kinetikai számítások is több kérdést felvetnek. Hogyan lehet a (8) és (9) egyenletekben a negatív előjellel elszámolni? A modell szerint három állapot van (legalábbis a vonatkozó CEJ cikk SI-jában ezt írják), azaz a diffúziós lépés nem tekinthető egy elemi lépésnek, tehát nem írható fel indoklás nélkül egy sima bimolekuláris egyenlet, mint ami a (8) egyenletben van. Másszóval, amit az N_{ki-be} -be mér, az három, jól definiált állapot közötti átmenet, azaz két lépés eredménye (ahogy az SI-ben van: solvent - protein - heme pocket), vagyis könnyen lehet, hogy más, akár még komplikáltabb koncentrációfüggés adódik a sebességre, mint amit a (8) egyenlet jelöl. Ez a kérdés így arra is vonatkozik, hogy mennyiben jogos a teljes szimulációs időtartamot használni a (8) egyenletben? A (9) egyenletben található $t_{XO,zseb}$ időtartamot hogyan kell meghatározni, ha elvileg lehetséges, hogy egyszerre több ligandum is tartózkodhat a zsebben?

Köszönöm szépen ezeket az elgondolkodtató kérdéseket. Az egyszerűség kedvéért a válasz elején szeretném itt megismételni mind a modellünket, mind a felhasznált egyenleteket.

Modell:



És a diffúziós reakciósebességi együtthatók megbecslésére használt egyenletek:

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

$$\frac{d[XO]_{ki}}{dt} = -k_{-1}[E \cdots XO] = \frac{N_{ki-be}}{N_A} \cdot \frac{1}{t_{XO,zseb} \cdot V} \quad (2)$$

A fentebb látható kétlépcsős modellt elterjedten használták és használják hemfehérjék kísérleti és elméleti vizsgálata esetén. A legtöbb kísérleti eredmény gázmolekulák és hemfehérjék reakciója kapcsán laser flash fotolízis tanulmányokból származik, amelyekben a kötött formából indulnak ki, egy lézerimpulzussal gerjesztik a molekulát. Ez a kétatomos ligandum disszociációjához vezet, s azt mérik, hogy milyen gyorsan alakul ki újra kötés, s ebből származtatják a különféle sebességi együtthatókat. S való igaz, hogy pl. az O₂ és mioglobín/hemoglobín kötődése nem írható le ezzel az egyszerű kétlépcsős modellel. Miután gerjesztették a oximioglobín komplexet (s különösen bizonyos mutáns változatokat), egészen egyértelművé vált, hogy a fotolízis után az oxigén újrakötődése kétfázisú karakterisztikát mutat, amelyben a gyors fázis azt írja le, amikor az oxigén közvetlenül a vasion közeléből kötődik vissza, míg a lassú fázis annak felel meg, amikor az oxigénmolekula a fehérje távolabbi részeiből diffundál vissza az aktív zsebbe.¹³ Vagyis tökéletesen igaza van a Bírálónak abban, hogy az gázmolekula-diffúzió nem írható le olyan egyszerűen a mi kétlépcsős modellünkkel, s főleg atomi szinten bonyolultabb a reakció koncentrációfüggése.

Ugyanakkor gyakorlati szempontból ez a kétlépcsős modell is jól működik, és a mi másodrendű kinetikai egyenletünkéből származtatott másodrendű sebességi együtthatók jó egyezést mutatnak a mért látszólagos sebességi együtthatókkal.

Markov-modelleket egyre elterjedtebben használnak különböző biológiai problémák vizsgálatára, mint pl. fehérje és RNS molekulák feltekeredése, termékek disszociációja. Az MD szimulációban megfigyelt szerkezeteket először mikroállapotokba, majd ezeket kinetikailag releváns makroállapotokká csoportosítják.¹⁴ Blumberger és társai a mi Markov-modellünkénél sokkal részletesebb modelleket használtak gázdifúzió vizsgálatára, ahol a fehérjében azonosították az összes helyet, ahol a gázmolekulák előfordultak, majd ezeket klaszterezték, s meghatározták az egyes klaszterek között a gázmolekulák vándorlásának reakciósebességi együtthatóit.^{15,16} Végül, egy pszeudoelsőrendű kinetikai modellt alkalmazva határozták meg a gázok diffúziós reakciósebességi együtthatóját, mert alapvetően ez vethető össze a kísérletileg mért látszólagos sebességi együtthatókkal. Ebben az értelemben a mi diffúzió vizsgálatára használt modellünk egy nagyon durvaszemcsés Markov-modell, amelyben három kinetikailag releváns állapotot azonosítottunk, és az egyensúlyi állapotból meghatározott ki és be diffúzióra számított reakciósebességi együtthatókat vetettük össze a kísérleti adatokkal, amelyek

szintén egy nagyon egyszerű modellen alakultak, s vagy másodrendű vagy pszeudo-elsőrendű kinetikát feltételeztek.

Hogyan lehet értelmezni a negatív előjelet a (8)-as és (9)-es egyenletekben? Talán nem szerencsés a jelölés, de a $\frac{d[XO]_{be}}{dt}$ tag valójában azt fejezi ki, mennyivel csökken a gázmolekula koncentrációja az oldószerben, vagyis negatív, és ebben az értelemben a N_{ki-be} értékét negatívnak kell tekinteni. Hasonló az érvelés a (9) -es egyenlet esetében is: $\frac{d[XO]_{ki}}{dt} = -\frac{d[E \cdots XO]}{dt} = -k_{-1}[E \cdots XO]$, és N_{ki-be} arra utal hányszor jut ki az NO molekula a fehérje komplexből, vagyis itt is negatív értéke van.

Mennyiben jogos a teljes szimulációs időtartamot használni a (8) egyenletben? Azt gondolom, hogy konceptuálisan nem megalapozott, hogy a teljes időtartamot használjuk a (8)-as egyenletben, még ha az első cikkünkben ezt is tettük. A kinetikai egyenleteink egyensúlyt feltételeznek, vagyis akkor érvényesek, ha már beállt az egyensúly az NO eloszlásában az oldószer -fehérje- aktív zseb között. Ez nyilvánvalóan nem teljesül a szimuláció legelején, amikor az összes gázmolekula még az oldószerben található. Viszont Blumberger és társai azt találták, hogy gázmolekulák nagyon gyorsan bejutnak az oldószerből a fehérjébe (párszáz ps belül), ráadásul 10 ns alatt beáll az egyensúly a gázmolekulák eloszlásában a különböző helyszínek között. Ebben az értelemben nem vétettünk nagy hibát azzal, hogy a 300 ns-os szimuláció teljes egészét figyelembe vettük, mert kb. a trajektória 3%-a lehetett nem egyensúlyi.

Második cikkünkben,¹⁷ amelyben H-NOX fehérjéket vizsgáltunk, már jobban figyeltünk erre a kérdésre. Egyrészt a trajektóriák első 100-150 ns-át nem használtuk fel az analízishez, hogy biztosan teljesüljön, hogy beállt az egyensúly az gázmolekulák eloszlásában a különböző helyszínek között. Továbbá, meghatároztuk a sebességi állandókat a trajektóriák különböző hosszúságú részleteit felhasználva, feltételezve azt, hogy ha beállt az egyensúly, akkor egy 200ns hosszúságú trajektória során kétszer több be-ki diffúziós eseményt kell megfigyelnünk, mint a trajektória 100 ns hosszúságú részletében. A kapott diffúziós reakciósebességi együtthatók értékében max 15%-os eltérést kaptunk, így elfogadtuk azt, hogy már beállt az egyensúly.¹⁷

A (9) egyenletben található $t_{XO,zseb}$ időtartamot hogyan kell meghatározni, ha elvileg lehetséges, hogy egyszerre több ligandum is tartózkodhat a zsebben? Véleményem szerint attól függetlenül, hogy hány gázmolekula tartózkodik a zsebben, a $t_{XO,zseb}$ időtartamot ugyanúgy kell meghatározni: akkor van betöltve a zseb, ha legalább egy ligandum található benne, mert az az időtartam, ami alatt a geminális párt tartalmazó $[E \cdots XO]$ komplex létezik, s el tud bomlani.

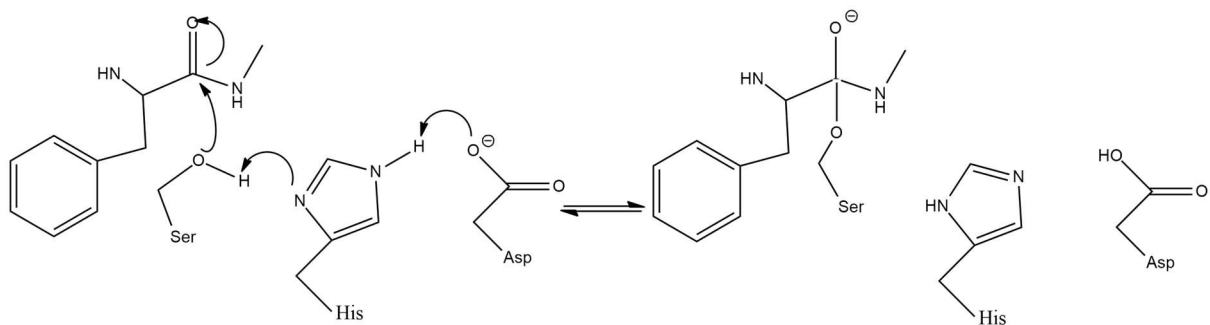
A 79. oldalon található energiaprofillal kapcsolatosak a következő kérdések. A folyamat egy meglepő protonálást mutat annyiban, hogy egy várhatóan gyengébb sav (alkohol) protonálja a lizin oldalláncot és így keletkezik egy olyan sav, ami erősebb sav, mint az alkohol. Mivel lehet

magyarázni, hogy az adott körülmények között szemlátomást a protonált lizin a gyengébb sav? Az energiaprofil alapján a terméképződés, azaz a hidridtranszfer nem várható, hiszen a protontranszferből kialakuló közti terméknel jóval magasabb energiaszinten van (könnyen, minimális gáton keresztül visszalakul). Mi adja ennek a számított útnak akkor a jelentőségét, amikor ezt a hidridtranszfert ennek a profilnak az alapján nem lehetne megfigyelni? Ez a kérdés vonatkozik a 43. ábrára is, ahol a termékállapotok szintén jelentősen magasabban vannak energiában, mint a köztes állapotok; ráadásul itt három esetben a termékenergiák még a képződésükhöz vezető TS energiaszinteknél is magasabban vannak, ami szintén magyarázatra szorul.

Nagyon szépen köszönöm ezeket az elgondolkodtató kérdéseket. Fehérjék esetében az egyes oldalláncok protonáltsági állapota nagyon jelentősen függ a környezettől. Ilyen értelemben nemcsak az Asp, Glu, His, Lys, Arg, de meglepő módon Cys, Tyr és Ser aminosavak protonáltsági állapota is változatos. A fehérjék felületén, ahol az oldalláncok kölcsönhatnak a vízzel, mint oldószerrel, jellemző, hogy a csoportok pKa értéke közel esik az aminosav oldatban mérhető pKa értékhez. Ugyanakkor a fehérjék belsejében a kölcsönhatások igen jelentősen módosíthatják az adott oldallánc pKa értékét. Találkoztam olyan esettel például, ahol egy Asp és egy Glu oldallánc alakított ki egymással hidrogénhidat a kristályszerkezetben mérhető távolságok alapján, ami szinte csak akkor fordulhat elő, ha legalább egyikük neutrális.

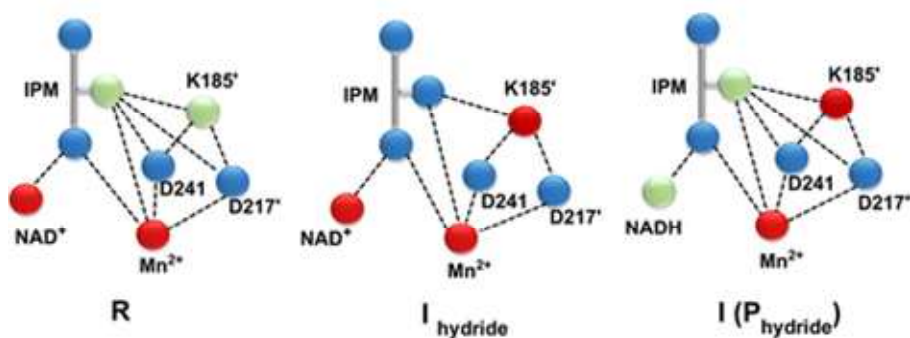
A fentebbiek miatt kifejezetten fontos fehérjéken végzett szimulációk előtt megvizsgálni az oldalláncok várható protonáltsági állapotát. Ezt általában empirikus módszerekkel teszik meg, legismertebbek a PropKa és a H++. Ezek egyszerű szerkezeti tulajdonságok függvényében becsülik meg az ionizálható oldalláncok pKa értékét. A vizsgált tulajdonságok közé tartozik pl. hogy az adott oldallánc a fehérje felszínén található vagy a fehérjén belül, milyen más ionizált csoportokkal vagy ionokkal hat kölcsön, mennyire apoláris a zseb.

Sok enzim katalitikus ciklusa tartalmaz általános sav-bázis katalízist, amely részben azért is jöhet létre, mert az enzimmagkörnyezet módosítani tudja egy adott oldallánc pKa értékét különböző kölcsönhatások révén. Erre nagyon jó példa a kimotripszin esete (3. ábra). A kimotripszin aktív helyén egy Asp-His-Ser triád felelős a katalízisért. Az Asp erős hidrogénhidat alakít ki a His δ -nitrogénjéhez kötődő protonnal és ezáltal megnöveli az ϵ -nitrogén bázicitását (a konjugált sav pKa értéke 6-ról 12-13-ra növekszik). Ezáltal a His képes deprotonálni és aktiválni a Ser oldalláncot.



3. ábra Sav-bázis katalízis a kimotripszin esetében

Az IPMDH esetén a PropKa egyértelműen azt jósolta, hogy a Lys oldallánc pKa értéke 6 alatt van az IPM szubsztrát távollétében. Mi ennek az oka? Ha megnézzük a zsebben található oldalláncokat, akkor található 3 db Arg oldallánc, amelyek a szubsztrát megkötésében vesznek részt, 3 db Asp oldallánc, amely közül 2 a Mn^{2+} ion koordinációjában kulcsfontosságú, 1 pedig a K^+ ion koordinációjában vesz részt. Az ösztöltés így IPM hiányában +3 körül van, s nyilván ez segíti elő az IPM bekötődését. Amint az IPM bekötődik a zsebbe ezzel 2 új karboxilcsoport jelenik meg, ami hozzájárul ahhoz, hogy a Lys konjugált savjának növekedjen a pKa értéke, s fel tudja venni a hidroxilcsoport protonját. Azt is fontos szerintem látni, hogy a hidroxilcsoport protonjának azért csökken le a pKa értéke, mert az oxigénje Mn^{2+} ionhoz koordinálódik és az elektrosztatikus kölcsönhatások sokkal kedvezőbbek ha a negatív töltésű hidroxilátcsoport hat kölcsön a divalens kationnal, mint ha egy semleges töltésű hidroxilcsoport. Összességében az elektrosztatikai kölcsönhatások kifejezetten elősegítik azt, hogy az amin deprotonálja az IPM hidroxilcsoportját. Alább megismétlem a dolgozat 44. ábráját (4. ábra), amelyeken az R és I_{hydride} állapotokat érdemes összehasonlítani, ezek felelnek meg a protontranszfernek. Abban a pillanatban amikor az IPM beköt, az hidroxilcsoport semleges és ez hat kölcsön a Mn^{2+} ionnal, viszont a lizinre történő proton transzfer által pozitív töltésűvé váló Lys 3 új sóhidat tud kialakulni, ami stabilizálja az I_{hydride} állapotot.

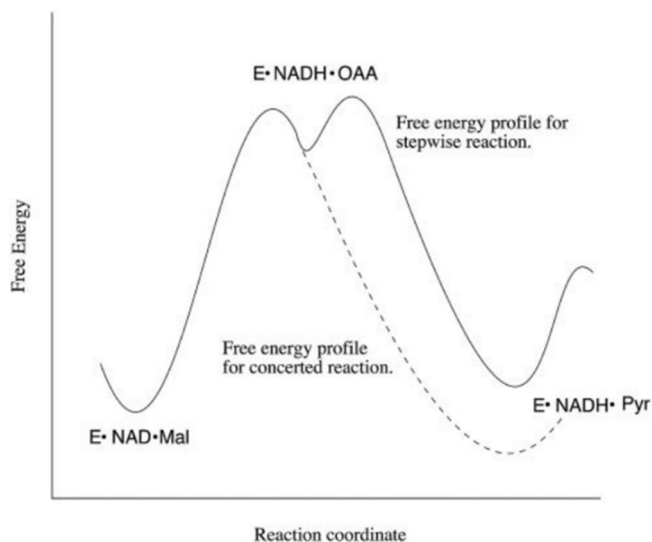


1. ábra Az IPMDH enzim vad típusában kialakuló legfontosabb elektrosztatikus kölcsönhatások sematikus ábrázolása. A különböző töltésű

csoportokat eltérő színnel jelöltem: semleges: zöld, negatív töltésű: piros, pozitív töltésű kék

Az általunk javasolt protonátadás egyáltalán nem szokatlan az oxidatív dekarboxilázok körében, a közeli rokon malát-dehidrogenáz enzimben nagyon hasonló a reakciómechanizmus. Ott azt javasolták, hogy az aktív helyen található egy olyan Asp oldallánc, ami nem kötődik a divalens kationhoz, s ez deprotonálja és aktiválja a megfelelő lizin oldalláncot, hogy deprotonálni tudja a malát szubsztrát hidroxilcsoportját.¹⁸

Felmerült az a jogos kérdés is, hogy mi adja a vizsgált proton- és hidridtranszfer utak jelentőségét, ha ez bizonyosan nem megfigyelhető, hiszen kis gáton keresztül visszaalakul a köztitermék a kiindulási anyaggá. Erre valóban nem tértem ki a dolgozatban, s ezért is nagyon értékesnek tartom ezt a kérdést. A rokon malát-dehidrogenáz enzim esetében, mind a csirkéből, mind az emberből izolált enzim esetén vannak olyan kinetikai mérések, amelyeket úgy végeztek el, hogy a köztitermékéből indították el a reakciót, vagyis a mi munkánkban P_{hidrid}-ként elnevezett állapotból (oxaloacetát és NADH volt az enzim zsebében.) Mindkét esetben kétféle terméket kaptak, egyrészt megkapták a kiindulási anyagoknak megfelelő terméket (malát + NAD⁺), másrészt a végterméket: piruvát + NADH + CO₂. Csirkéből származó enzim esetében¹⁹ a kapott termékek aránya: 1:0,47, míg az emberi enzim²⁰ esetén pedig 1:2,33. A reakció kísérleti csoport által javasolt szabadentalpia-profilja az 5. ábrán látható. Mivel a köztitermékéből mindkét irányba lejátszódhat a reakció ez egyértelműen arra utal, hogy annak szabadentalpiája magasabb, mint a kiindulási anyagoké, s ez összhangban van a mi számítási eredményeinkkel (még ha csak egy rokon enzimről van is szó). Viszont teljes mértékben belátom, hogy ezt nagyon jó lett volna az értekezésben is bemutatni.



5. ábra. A malát-dehidrogenáz enzim reakciójának szabadentalpia-profilja. Az ábra a ref. ²⁰ hivatkozás 4. ábrájával azonos. A szimulációink szempontjából a folytonos görbe a lényeges, amely mutatja, hogy a NAD^+ -ra irányuló hidridtranszfer során képződő köztitermék szabadentalpiája magasabb, mint a kiindulási anyagé vagy a végterméké.

Elgondolkodtam azon, hogy mi adja a vizsgált reakcióút jelentőségét. Számomra leginkább az, hogy sikerült a kísérleti kollégák kérdésére válaszolni. Egy olyan kristályt állítottak elő, amelyben minden reakcióhoz szükséges “adalék” jelen volt a NAD^+ kivételével, amely helyett a szubsztrátanalóg, NADH volt a kristályban. Az volt az a kérdésük, hogy alá tudom-e támasztani, hogy a kristályszerkezet jó modellje az enzim-szubsztrát komplexnek, s azt hiszem, hogy ez sikerült. A számítások azt mutatták, hogy ha a NADH -t, NAD^+ -ra lecserélem a számításaimban, akkor a reakció első lépése viszonylag alacsony gátakon keresztül megvalósulhat. Ökölszabályként azt szokták mondani, hogy a szervezetben 15, esetleg 20 kcal/mol alatti gátakkal jellemezhető reakciók játszódhatnak le elfogadható sebességgel. Ezenkívül további érdekes mechanisztikai információkat is szolgáltatottak a számítási eredmények, s értelmezni tudtuk a mutációk hatását a reakciómechanizmusra.

Sajnos abban az igyekezetemben, hogy tömören fogalmazzak, nagyon rövidre sikerült a 43. ábra magyarázata az értekezés szövegében. Az ábrán látható reakcióprofilok valójában töltésdeléciós analízissel^{21,22} készültek, vagyis a vad típusú enzimben meghatározott kritikus pontokban meghatároztam a rendszer energiáját úgy, hogy az adott oldallánc töltését nullára állítottam. Ehhez egy kisebb QM régiót kellett használnom, hiszen csak az MM régióban található atomok töltését tudom “önkéntelenül” változtatni. Ezzel a módszerrel arról lehet információt nyerni, hogy adott oldallánc milyen mértékben befolyásolja elektrosztatikus kölcsönhatás révén a

reakciót. Amennyiben a számított energiák magasabbak a mutánsban (vagyis, amelyikben lenulláztam az oldallánc töltését), az arra utal, hogy az adott oldallánc elektrosztatikus módon elősegíti a katalízist. Ha nem változik az energia, akkor elektrosztatikus úton nem befolyásolja a katalízist, s ha csökkenne, akkor pedig gátolná a katalízist. Azt hiszem ez az egyetlen fajta információ, amit le szabad vonni az ábrából.

Egészen nyilvánvaló, hogy a valóságban a mutánsokban a szerkezetek nem lehetnek ugyanazok, mint a vad típusú enzimben, ha pl. lecseréljük az egyik Mn²⁺-kötő aszpartát oldalláncot (ahogy kísérletileg meg is tették), akkor a katalízis nem csak az aszpartát elektrosztatikus hatása miatt károsodik, de csökkenhet az enzim Mn²⁺ kötőképessége, harmadlagos szerkezete, de akár létezhetnek olyan változások is az enzim szerkezetében, amellyel kompenzálódhat a mutáció káros hatása. Túlságosan idő és erőforrás igényes lett volna minden egyes mutáns szerkezetét *in silico* meghatározni, megjósolni, és a QM/MM számításokat elvégezni, a töltésdeléciós analízis viszont legalább kicsit hozzájárult az egyes aminosavak szerepének a megértéséhez.

Szeretném még egyszer megköszönni Dr. Stirling András 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) 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>.
- (2) 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>.
- (3) 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>.
- (4) 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.
- (5) 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>.
- (6) Lonsdale, R.; Oláh, J.; Mulholland, A. J.; Harvey, 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>.
 - (7) Walker, V. E. J.; Castillo, N.; Matta, F.; Boyd, R. J. The Effect of Multiplicity on the Size of Iron (II) and the Structure of Iron (II) Porphyrins. **2010**, Sz. II, 1–5.
 - (8) 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>.
 - (9) Zheng, J.; Wang, D.; Thiel, W.; Shaik, S. QM/MM Study of Mechanisms for Compound I Formation in the Catalytic Cycle of Cytochrome P450cam. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (40), 13204–13215. <https://doi.org/10.1021/ja063439l>.
 - (10) Schöneboom, J. C.; Neese, F.; Thiel, W. Toward identification of the compound I reactive intermediate in cytochrome P450 chemistry: A QM/MM study of its EPR and mössbauer parameters. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (16), 5840–5853. <https://doi.org/10.1021/ja0424732>.
 - (11) Chen, H.; Ikeda-Saito, M.; Shaik, S. Nature of the Fe-O₂ bonding in oxy-myoglobin: effect of the protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (44), 14778–14790. <https://doi.org/10.1021/ja805434m>.
 - (12) 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>.
 - (13) 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>.
 - (14) Da, L. T.; Sheong, F. K.; Silva, D. A.; Huang, X. *Application of markov state models to simulate long timescale dynamics of biological macromolecules*; 2014; Köt. 805. https://doi.org/10.1007/978-3-319-02970-2_2.
 - (15) 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>.
 - (16) 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*, 1. kiad.; Elsevier Inc., 2016; Köt. 578. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.05.039>.
 - (17) 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>.
 - (18) 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>.
- (19) Cleland, W. W. The use of isotope effects in the detailed analysis of catalytic mechanisms of enzymes. *Bioorg. Chem.* **1987**, *15* (3), 283–302. [https://doi.org/10.1016/0045-2068\(87\)90026-5](https://doi.org/10.1016/0045-2068(87)90026-5).
- (20) 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>.
- (21) 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>.
- (22) 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>.