



Politechnika Wroclawska

Teoretyczne metody badania właściwości katalitycznych enzymów oraz inhibicji na przykładzie mutazy choryzmianowej i amoniakolizazy fenyloalaninowej

Borys Szefczyk

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. inż. W. Andrzeja Sokalskiego

Zakład Modelowania Molekularnego,
Instytut Chemii Fizycznej i Teoretycznej,
Wydział Chemiczny,
Politechnika Wroclawska

Wrocław, 2005

Składam gorące podziękowania

- promotorowi, prof. W. Andrzejowi Sokalskiemu, za wszechstronną pomoc, liczne dyskusje i rady;
- prof. Adrianowi J. Mulhollandowi, za wsparcie w trakcie pobytu na Uniwersytecie Brytyjskim oraz współpracę;
- dr Jerzemu Zoniowi, za współpracę przy badaniach dotyczących amoniakolizacji fenylalaninowej;
- pracownikom i doktorantom z Zakładu Modelowania Molekularnego za pomoc i miłą atmosferę w pracy;
- wszystkim innym, którzy przyczynili się do powstania tej pracy.

Rozdział 1

Wprowadzenie

Zarówno w przemyśle chemicznym jak i w skali laboratoryjnej powszechnie wykorzystuje się katalizatory. Spośród nich interesujące są zwłaszcza te o dużej wydajności oraz specyficzności. Znaczne obniżenie bariery aktywacji pozwala prowadzić reakcję w łatwiejszych warunkach, z większą wydajnością i mniejszym zagrożeniem dla środowiska. W przypadku reakcji, w której mogą powstawać różne produkty lub jeden produkt w różnych formach, użycie katalizatora o określonych właściwościach pozwala otrzymać jeden, pożądaný produkt (na przykład polimer o określonej taktyczności¹). Interesującymi katalizatorami, ze względu na swoją wydajność, specyficzność i warunki „pracy”, są enzymy. Ich zastosowanie w katalizie zaczyna wykraczać poza biochemię, gdyż ze względu na wymienione powyżej właściwości są one atrakcyjne pod względem zastosowań przemysłowych. Istnieją możliwości i perspektywy modyfikacji enzymów w celu przystosowania ich do wybranych zastosowań.² Taka możliwość jest niejako „wbudowana” w naturę enzymów — wiele z nich może katalizować (słabo) cały szereg reakcji i wprowadzenie pewnych zmian, poprzez na przykład mutację, umożliwi zaadoptowanie enzymu do nowej funkcji.³

Aby projektować katalizatory umożliwiające syntezę z zachowaniem pożądaných właściwości produktów na poziomie molekularnym (na przykład określonej chiralności), konieczne jest poznanie i zrozumienie funkcjonowania na takim właśnie poziomie — w skali atomowej. W przypadku enzymów oznacza to wyjaśnienie roli poszczególných reszt tworzących centrum aktywne, w przypadku katalizatorów syntetycznych oznacza to na przykład zrozumienie wpływu podstawników na przebieg reakcji. Choć pierwsze koncepcje dotyczące mechanizmu działania enzymów zostały zaproponowane już w latach czterdziestých ubiegłego wieku,⁴ to jednak dyskusje na ten temat toczą się do dziś. Wyjaśnienie mechanizmu działania dostępnych katalizatorów jest więc istotnym etapem w drodze do projektowania nowych związków tego typu.

Osobnym zagadnieniem w teorii katalizy enzymatycznej wywołującym

ostatnio wiele kontrowersji jest rola efektów dynamicznych. Obniżenie bariery aktywacji może być wynikiem oddziaływania substratu lub stanu przejściowego z nieruchomym fragmentem otoczenia katalitycznego (taki rodzaj efektu katalitycznego określany jest w niniejszej pracy jako efekt statyczny). Ponadto, dodatkowe obniżenie bariery aktywacji może być wywołane ruchem reagujących cząsteczek lub ruchem otoczenia katalitycznego. W wielu pracach^{5,6,7} zwraca się uwagę na ruch pojedynczych reszt, pętli, czy też całych fragmentów, skorelowany ze współrzedną reakcji.

1.1 Aktywność katalityczna enzymów

Enzymy są środowiskiem reakcji o szczególnych właściwościach, pozwalających uzyskać warunki do prowadzenia reakcji niemożliwe do osiągnięcia w inny sposób. Wartości pK_a od skrajnie niskich do skrajnie wysokich, ściśle określony rozkład ładunku, precyzyjnie rozmieszczone w przestrzeni grupy funkcyjne — to cechy, które decydują o wyjątkowych własnościach katalitycznych enzymów. To dzięki nim osiąga się wysoką stereospecyficzność i selektywność.⁸ Ze względu na swój skład chemiczny, utrzymanie aktywności katalitycznej enzymu wymaga łagodnych warunków — temperatury zbliżonej do pokojowej, pH nieodbiegającego znacznie od obojętnego i roztworu wodnego. Z jednej strony jest to pewne ograniczenie, ale z drugiej strony fakt ten sprawia, że enzymy spełniają wymogi „zielonej chemii”, tym bardziej, że ich wysoka selektywność ogranicza ilość niepożądanych produktów i problemy związane z ich odseparowaniem i unieszkodliwieniem. Liczne enzymy znalazły zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu, między innymi w produkcji prostych związków, takich jak akrylamid (nitrylaza), w przemyśle spożywczym (np. produkcja aspartamu — termolizyna), w przemyśle farmaceutycznym (np. produkcja antybiotyków, pochodnych β -laktamu — amidaza penicyliny), czy w produkcji bardziej złożonych związków, zwłaszcza o określonej izomerii optycznej, na przykład w produkcji L-aminokwasów — metioniny, waliny i alaniny, czy kwasu L-malonowego (fumaraza).^{8,2}

Wiele enzymów charakteryzuje się tak dużą wydajnością (wyrażoną* przez stosunek k_{cat}/K_m), że o szybkości katalizowanej reakcji zaczyna decydować dyfuzja substratów i produktów.⁹ Enzymy takie jak na przykład fumaraza, czy anhidraza węglanowa charakteryzują się wartością k_{cat}/K_m porównywalną z prędkością wychwytywania cząsteczek substratu z roztworu, czyli rzędu $10^9 s^{-1} M^{-1}$.¹⁰ W takim przypadku nie da się już praktycznie „poprawić” wydajności enzymu. Od niedawna, wysiłki naukowców skupiają się na przykład na wprowadzaniu funkcji katalitycznych do białek, które takich funkcji nie posiadają — tu za przykład może posłużyć białko wiążące rybozę, dla którego udało się zaprojektować mutacje pozwalające na

* k_{cat} jest szybkością przemiany substratu związanego w centrum aktywnym w substrat, a K_m jest stałą Michaelisa

wytworzenie aktywności katalitycznej podobnej do izomerazy triozyfosforanowej.¹¹ Możliwa i bardzo interesująca z praktycznego punktu widzenia jest również modyfikacja istniejących enzymów, tak aby móc wykorzystywać inne substraty lub wręcz katalizować inne reakcje,³ w szczególności takie, dla których nie ma naturalnych katalizatorów. Sporą uwagę poświęca się zastosowaniu enzymów do rozkładu zanieczyszczeń, w tym również pestycydów i związków używanych jako broń chemiczna.^{12,13,14}

1.2 Systematyka efektów katalitycznych

Współczesna wiedza na temat sposobu w jaki enzymy osiągnęły swoją ogromną wydajność (mierzoną liczbą obrotów (k_{cat}), czy też przyspieszeniem względem reakcji niekatalizowanej (k_{cat}/k_{uncat})), jest wynikiem mniej więcej sześćdziesięciu lat badań, zarówno metodami chemii eksperymentalnej jak i teoretycznej. Można chyba śmiało przyjąć, że dla zrozumienia źródeł nadzwyczajnej aktywności katalitycznej enzymów, kluczową była teza wysunięta przez Linusa Paulinga w 1946 roku.⁴ Głosiła ona, że przyczyną wysokiej wydajności enzymów jest silniejsze wiązanie stanu przejściowego (TS), co prowadzi do obniżenia bariery aktywacji. Na tej właśnie idei opiera się koncepcja stabilizacji stanu przejściowego oraz prezentowana w podrozdziale 2.2 koncepcja różnicowej stabilizacji stanu przejściowego. Na przestrzeni ostatnich sześćdziesięciu lat, badano wiele innych czynników, które mogą być odpowiedzialne za przyspieszenie reakcji chemicznych w enzymach – są to między innymi efekty takie jak destabilizacja substratu,¹⁵ drgania i ruchy promujące^{5,16,17,18} czy tunelowanie.^{19,20} W literaturze dostępne są znakomite publikacje systematyzujące efekty katalityczne w sposób ogólny (na przykład odsyłacz 21 w Bibliografii), toteż ten rozdział stanowi jedynie krótką charakterystykę tych efektów dla potrzeb niniejszej pracy i skupia się na efektach katalitycznych w enzymach.

Czynniki wpływające na wydajność enzymów można podzielić w oparciu o równanie na stałą szybkości reakcji:^{22,21}

$$k_{cat}(T) = \gamma(T) \left(\frac{k_B T}{h} \right) (C^0)^{-n} \exp \left(\frac{-\Delta G^{TS,0}(T)}{RT} \right) \quad (1.1)$$

gdzie n oznacza rząd reakcji, a C^0 — stężenie standardowe. Zgodnie z tym równaniem, stała szybkości reakcji jest iloczynem współczynnika przejścia ($\gamma(T)$) oraz wyrażenia eksponencjalnego, zawierającego kwazitermodynamiczną entalpię swobodną aktywacji²¹ ($\Delta G^{TS,0}(T)$). Na tej podstawie wydziela się grupę dynamicznych efektów katalitycznych, które nie obniżają entalpii swobodnej aktywacji, ale wpływają na stałą szybkości reakcji poprzez współczynnik przejścia. W szczególności, zgodnie z równaniem:

$$\gamma(T) = \Gamma(T)\kappa(T)g(T) \quad (1.2)$$

można wyróżnić efekt wielokrotnego przekraczania bariery ($\Gamma(T)$) polegający na tym, że układ po przejściu przez punkt siodłowy powraca na stronę substratów ($\Gamma(T)$ jest zawsze mniejsze lub równe 1, czyli zmniejsza szybkość reakcji), efekt tunelowy ($\kappa(T)$, obserwowany zwłaszcza w przypadku enzymatycznych reakcji przeniesienia protonu¹⁹). Efekt ten wpływa na przyspieszenie reakcji ($\kappa(T)$ jest zawsze większe lub równe 1) oraz efekt wynikający z nierównowagowego rozkładu stopni swobody w przestrzeni fazowej ($g(T)$). Czynniki $\Gamma(T)$ został wyznaczony między innymi dla dehydrogenazy alkoholowej¹⁹ i reduktazy dihydrofolianowej,^{23,24} a $\kappa(T)$ udało się obliczyć na przykład dla enolazy ($\kappa(T) = 1.7$), dehydrogenazy metyloaminy ($\kappa(T) = 84$) oraz izomerazy ksylozowej ($\kappa(T) = 7$).²⁰ Jak dotąd nie udało się oszacować dla żadnej reakcji enzymatycznej czynnika $g(T)$, ale uważa się, że powinien on być bliski jedności.²¹ Obserwowana eksperymentalnie bariera aktywacji ΔG^\ddagger pozostaje w następującej relacji z parametrami występującymi w równaniu 1.1:²¹

$$\Delta G^\ddagger = \Delta G^{TS,0} + \Delta G_\Gamma + \Delta G_\kappa + \Delta G_g \quad (1.3)$$

$$\Delta G_\Gamma = -RT \ln \Gamma(T) \quad (1.4)$$

$$\Delta G_\kappa = -RT \ln \kappa(T) \quad (1.5)$$

$$\Delta G_g = -RT \ln g(T) \quad (1.6)$$

Pozostałe efekty katalityczne wpływają na przyspieszenie reakcji poprzez obniżenie entalpii swobodnej aktywacji ($\Delta G^{TS,0}(T)$). Najistotniejszym czynnikiem, dominującym w przypadku większości enzymów jest stabilizacja stanu przejściowego (TSS).^{25,4,26,27,28} Co więcej, w wielu przypadkach efekt ten jest zdominowany przez oddziaływanie elektrostatyczne.^{29,30,28,27} Kolejną ważną koncepcją, jest efekt doboru odpowiedniej konformacji substratu. Występuje ona w postaci kilku pokrewnych pojęć — jako naprężenie substratu³¹ (*substrate strain*, pojęcie zaproponowane przez Haldane'a^{25,26}), wymuszone dopasowanie^{32,33} (*induced fit*) organizacja substratu³⁴ (*substrate preorganization*) oraz teoria reaktywnego konformeru zaproponowana przez Bruice'a^{35,36,37} (*near attack conformer*, NAC). Istotą tego efektu jest zdolność centrum aktywnego do związania ściśle określonej konformacji substratu, geometrycznie zbliżonej do struktury stanu przejściowego — taka konformacja jest już gotowa do przereagowania, czyli przekroczenia bariery. Należy podkreślić, że w bieżącej literaturze istnieje duża rozbieżność poglądów na temat udziału efektu NAC w katalizie i można znaleźć zarówno prace, które wskazują na duży wkład tego czynnika do obniżenia bariery aktywacji,^{36,38,39} jak i prace pokazujące, że jest on mały.^{30,40} Analogicznie do stabilizacji stanu przejściowego, obniżenie bariery aktywacji może następować za pośrednictwem destabilizacji substratu. Ten mechanizm obniżenia bariery aktywacji jest obserwowany na przykład w przypadku heksokinazy — enzymu obecnego w ludzkim mózgu i odpowiedzialnego za fosforylację glukozy.¹⁵ Również ta teoria jest poddawana w wątpliwość przez Warshela

i współpracowników,⁴¹ jednak o ile działanie wyłącznie poprzez destabilizację substratu może faktycznie nie być wykorzystywane przez enzymy, o tyle z całą pewnością efekt destabilizacyjny może być obserwowany w przypadku pojedynczych reszt, przy zachowaniu stabilizacji substratu jako sumy wszystkich wkładów.²⁷

Wymienione czynniki: stabilizacja stanu przejściowego, destabilizacja substratu i NAC, są w niniejszej pracy klasyfikowane jako czynniki statyczne. Osobną grupę stanowią efekty dynamiczne, które również wpływają na wysokość bariery reakcji, ale ich podłożem są zmiany w konformacji enzymu lub reagującego substratu, zachodzące w trakcie reakcji. Należy tutaj podkreślić, że pojęcie „efekt dynamiczny” bywa w literaturze rozumiany w różny sposób. Niektórzy badacze określają tym mianem czynniki, które nie wpływają na $\Delta G^{TS,0}(T)$, lecz zmieniają szybkość reakcji za pośrednictwem współczynnika przejścia, $\gamma(T)$. W niniejszej pracy, podobnie jak i w pracach D. G. Truhlara,²¹ przyjęto, że pojęcie „efekt dynamiczny” odnosi się do ruchu oraz drgań atomów, reszt i podjednostek białka. Jak wyjaśnia Schwartz,⁴² efekty dynamiczne, a konkretnie drgania promujące, nie muszą mieć związku ze współczynnikiem przejścia. Definicja przyjęta w niniejszej pracy jest wygodna ze względu na skojarzenie efektów statycznych i dynamicznych ze statycznymi i dynamicznymi polami katalitycznymi, o których mowa jest w rozdziale 2.5.

Dynamiczne efekty katalityczne mogą wykazywać różny charakter. Przede wszystkim można rozróżnić drgania promujące (*promoting vibrations*), które wynikają z ruchu oscylacyjnego atomów lub reszt, a także ruchy promujące (*promoting motions*), które nie mają charakteru periodycznego. Pierwszy z tych efektów — jeśli jest zgodny w fazie ze współrzedną reakcji — może obniżyć barierę reakcji.^{43,44} Mówiąc obrazowo, reakcja może „zaczekać” na ten moment kiedy zwykle oscylacje atomów zbliżą substrat do punktu siodłowego „za darmo”. Efekt ten może pojawiać się zarówno w ruchu otoczenia katalitycznego,^{43,16} jak i w ruchu atomów samego substratu. Złożenie wszystkich korzystnych wychyleń z położenia równowagi układu reagującego, może również znacznie obniżyć barierę reakcji.⁴⁵ Drugi rodzaj efektu dynamicznego to ruchy promujące. Są to zwykle przemieszczenia większych fragmentów otoczenia molekularnego, takich jak reszty,^{5,23,46,6} czy nawet całe podjednostki.⁷ Osobnym zagadnieniem jest skala czasowa efektów dynamicznych — jeśli ruch otoczenia katalitycznego przebiega o rzędy wielkości wolniej niż reakcja, to dla reagującego układu takie otoczenie jest statyczne. Mimo to, bariera aktywacji może być inna w zależności od tego, w którym momencie ruchu otoczenia zajdzie reakcja, ponieważ pewne położenie ruchomego fragmentu otoczenia katalitycznego może być optymalne (powodować największe obniżenie bariery aktywacji). Efekt ten można nazwać zewnętrznym efektem dynamicznym. Jeśli skala czasowa ruchu otoczenia katalitycznego i skala czasowa reakcji chemicznej są porównywalne, wówczas wzajemne położenie reagującego układu i otoczenia ulega zmianie w trakcie

reakcji, co również może mieć wpływ na barierę aktywacji — tego rodzaju efekt, można określić mianem wewnętrznego efektu dynamicznego.

Wkład efektów dynamicznych do obniżenia bariery aktywacji jest przedmiotem burzliwych dyskusji. Jako przykład, może posłużyć tutaj wymiana opinii, która rozgorzała po artykułach Schwartza i współpracowników.^{47, 48, 42} Dotyczyła ona głównie wpływu oscylacji (drgań promujących) na szybkość reakcji w dehydrogenazie alkoholowej z wątroby końskiej. Zdaniem Warshela, efekty tego rodzaju nie przyczyniają się do obniżenia bariery aktywacji, ponieważ są podobne w środowisku wodnym i reakcji katalizowanej.²⁹ Jednak abstrahując od dowodów dostarczonych przez Schwartza na poparcie swojej tezy, udział efektów dynamicznych może najwidoczniej zależeć od wyboru punktu odniesienia.

1.3 Metody badania efektów katalitycznych

Ze względu na to, iż jednym z celów niniejszej pracy jest wzbogacenie istniejącego warsztatu o nowe metody służące do badania efektów katalitycznych oraz projektowania katalizatorów, warto poświęcić odrobinę uwagi metodom, które można już uznać za narzędzia standardowe. Zostaną tutaj omówione wybrane metody eksperymentalne i teoretyczne pozwalające na badanie mechanizmu katalizowanej reakcji na poziomie molekularnym. Są to: ukierunkowana mutageneza, kinetyczne efekty izotopowe, inhibitory–analogi stanów przejściowych, krystalografia rentgenowska i NMR, metody mechaniki i dynamiki molekularnej (MM i MD) oraz metoda QM/MM.

Ciekawą i stosunkowo nową metodą eksperymentalną, która stała się doskonałym narzędziem do badania aktywności katalitycznej enzymów jest ukierunkowana mutageneza⁴⁹ (SDM). Istotą tej metody jest otrzymywanie mutantów natywnego enzymu, zawierających ściśle określone mutacje, w określonych miejscach sekwencji. Jest to możliwe dzięki rozbudowaniu oligonukleotydu zawierającego mutację przy pomocy polimerazy DNA, i powieleniu łańcucha techniką PCR.⁴⁹ Dla szeregu takich mutantów można wykonać badania ich aktywności katalitycznej (parametrów k_{cat} oraz K_m), wnioskując na tej podstawie o udziale zmutowanych reszt w katalizie. Zwykle są to mutacje reszt leżących w centrum aktywnym lub jego pobliżu i polegają na wymianie reszty o określonych właściwościach (na przykład kwas lub zasada Lewisa albo grupa nukleofilowa) na resztę pozbawioną takich własności. Często wymienia się na przykład glutaminian na glutaminę albo asparaginian na asparaginę, czyli reszty o podobnej geometrii, ale innych właściwościach chemicznych. Techniki mutagenezy przyczyniły się do wyjaśnienia mechanizmów działania wielu enzymów, między innymi wykorzystano ją do badania reszt biorących udział w przegrupowaniu choryzmianu do preferianu w mutacji choryzmianowej.^{50, 51, 52, 53} Niestety, podobnie jak wiele innych metod eksperymentalnych, również i ta pozostaje metodą makroskopową i tylko po-

średnio umożliwia badanie enzymów na poziomie pojedynczych reszt. Wiele enzymów nie może być badanych tą drogą, ponieważ wymiana reszty istotnej dla katalizy powoduje, że inna reszta w centrum aktywnym przejmuje jej funkcje albo zmienia się mechanizm katalizowanej reakcji, co znacznie utrudnia identyfikację reszt zaangażowanych w katalizowaną reakcję.⁵⁴ Prawdopodobnie dzieje się tak w przypadku rybonukleazy T₁, gdzie usunięcie glutaminianu Glu58 powoduje, że pełnioną przez tą resztę funkcję zasady przejmuje sąsiadująca histydyna.⁵⁴ Metoda SDM doskonale uzupełnia się ze stosowaną w niniejszej pracy w odniesieniu do reszt w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej, metodą różnicowej stabilizacji stanu przejściowego (DTSS, rozdział 2.2). Obie metody pozwalają ocenić wkład danej reszty do obniżenia bariery aktywacji, przy czym metoda DTSS pozwala dodatkowo określić fizyczną naturę oddziaływania, a więc również rodzaj efektu katalitycznego.

Kolejną metodą eksperymentalną, pozwalającą badać mechanizm reakcji enzymatycznej na poziomie cząsteczkowym, a nawet wspomagać wyznaczenie struktury stanu przejściowego,^{55,56} jest metoda kinetycznego efektu izotopowego (KIE).⁵⁷ Polega ona na podstawieniu atomów zaangażowanych w zrywanie lub tworzenie wiązań chemicznych izotopami. Najczęściej stosowane izotopy, to deuter, tryt, węgiel (¹³C), azot (¹⁵N) i tlen (¹⁸O). Podstawienie atomu cięższym izotopem zmniejsza częstość drgania odpowiedzialnego za przejście układu przez barierę, co wpływa na zmniejszenie stałej szybkości reakcji. Wykonuje się również eksperymenty, w których podstawia się izotopem, nie bezpośrednio atom, który bierze udział w tworzeniu lub zrywaniu wiązania, ale atom sąsiedni — najczęściej atom wodoru (prowadzi to do tak zwanego efektu izotopowego drugiego rzędu). Badania efektów izotopowych są tym trudniejsze, im większa jest masa atomowa wymienianego pierwiastka, gdyż ze wzrostem masy izotopów obserwowane efekty stają się coraz mniejsze. Pomimo tych trudności udaje się wykorzystać nawet efekty izotopowe chloru,⁵⁸ którymi badano reakcje katalizowane przez dehalogenaży. Na podstawie porównania kinetyki reakcji przebiegającej z substratami znakowanymi oraz oryginalnymi można wyciągnąć wnioski dotyczące mechanizmu katalizy dla danej reakcji i wpływu poszczególnych fragmentów centrum aktywnego na barierę aktywacji. W ten sposób badano między innymi mechanizm reakcji katalizowanej przez amoniakoliazę fenyloalaninową^{59,57} (PAL, rozdział 1.5) oraz mutazę choryzmianową.⁶⁰ W przypadku mutazy choryzmianowej kinetyczne efekty izotopowe były również wyznaczone teoretycznie.^{61,62,63,64} Warto zaznaczyć, że już samo znakowanie izotopami może pomóc w określeniu mechanizmu reakcji: synteza substratów enzymu — hydrolazy fosfonoacetaldehydu, podstawionych izotopami tlenu⁶⁵ pozwoliła stwierdzić zachowanie konfiguracji na atomie fosforu i w ten sposób wykluczyć jeden z możliwych mechanizmów reakcji.⁶⁶

Ze względu na to, że podstawowym efektem odpowiedzialnym za katalizę wydaje się być stabilizacja stanu przejściowego, możliwość przyjrzenia

się strukturze stanu przejściowego oraz sposobowi w jaki jest on wiązany w centrum aktywnym może być kluczowa dla zrozumienia jak działa dany enzym. Jednak stan przejściowy jest strukturą istniejącą bardzo krótko⁵⁶ (jest to czas rzędu 10^{-13} s) i przez to nieuchwytną dla większości metod. Wgląd w to co dzieje się w centrum aktywnym mogą dać metody chemii teoretycznej wymienione w dalszej części tego rozdziału, natomiast spośród metod eksperymentalnych, wyobrażenie o tym jak wygląda stan przejściowy daje wspomniana powyżej metoda KIE oraz struktura inhibitorów, a zwłaszcza analogów stanu przejściowego (TSA). Związki tego typu są inhibitorami kompetycyjnymi, o strukturze bardzo podobnej do struktury stanu przejściowego, dzięki czemu charakteryzują się wyjątkowo dużym powinowactwem do centrum aktywnego.⁵⁶ Jako, że inhibitory są stabilnymi związkami, które nie ulegają reakcji w centrum aktywnym, możliwe jest nawet ustalenie struktury enzymu ze związanym inhibitorem za pomocą np. krystalografii rentgenowskiej. TSA służą również do generowania przeciwciał katalitycznych; udało się na przykład uzyskać przeciwciało katalizujące przegrupowanie Claisena choryzmianu do preferianu, reakcję zachodzącą w mutacji choryzmianowej.^{67,68,69} Oczywiście, tego rodzaju przeciwciało charakteryzuje się mniejszą wydajnością niż natywny enzym, co jest spowodowane różnicami w budowie TSA i stanu przejściowego.⁶⁹

Potężnym narzędziem w badaniach katalizy enzymatycznej jest krystalografia rentgenowska i spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Obie metody pozwalają na wyznaczenie struktury przestrzennej enzymu, w tym również struktur ze związanym w centrum aktywnym inhibitorem, substratem lub produktem. Spora ilość struktur enzymów jest zdeponowana w ogólnodostępnej bazie PDB.⁷⁰ Wiele struktur to mutanty i formy natywne tego samego enzymu co pozwala na bezpośrednie skorelowanie struktury centrum aktywnego i aktywności katalitycznej.

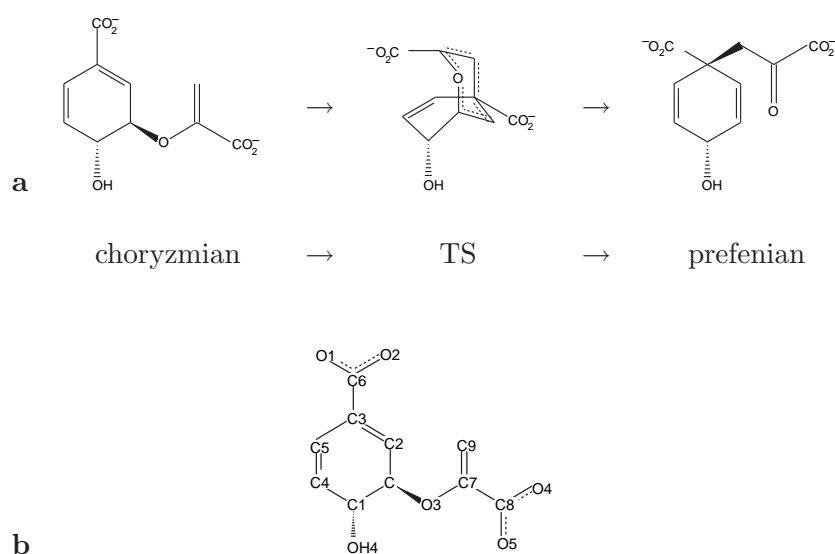
Rozwój metod modelowania molekularnego doprowadził do tego, że możliwe jest również badanie zagadnienia katalizy enzymatycznej metodami teoretycznymi. W sytuacji, gdy nie jest dostępna struktura enzymu z eksperymentu krystalografii rentgenowskiej czy NMR, można użyć strukturę uzyskaną z modelowania w oparciu o homologię. Takiej struktury użyto na przykład w badaniach inhibicji PAL.⁷¹ W problemach, które nie obejmują symulowania reakcji chemicznych (np. wiązanie inhibitora, substratu czy produktu) stosuje się metody mechaniki molekularnej (MM) i dynamiki molekularnej (MD). Pierwsza z tych metod umożliwia optymalizację geometrii dużych układów, takich jak np. enzymy, natomiast druga metoda umożliwia symulacje zachowania układu w określonym zespole statystycznym (najczęściej NVE, NVT oraz NPT). Obie metody opisują energię potencjalną układu za pomocą pola siłowego.⁷² Taki opis z jednej strony jest na tyle prosty i tani pod względem wymaganej mocy obliczeniowej, że umożliwia symulacje dla bardzo dużych układów, ale z drugiej strony nie pozwala na symulowanie reakcji chemicznych. Potencjał wiązania chemicz-

nego jest najczęściej opisywany w przybliżeniu harmonicznym, które jest dokładne tylko w pobliżu minimum energii potencjalnej i nie pozwala na zerwanie wiązania. Jednak nawet użycie potencjału, który zachowuje poprawną, asymptotyczną zbieżność do zera, gdy odległość pomiędzy jądrami rośnie do nieskończoności, nie może dać prawidłowego opisu układu, gdyż pola siłowe nie uwzględniają w ogóle struktury elektronowej układu, co jest nie zbędne przy opisie procesów zrywania i tworzenia wiązań.⁷² Oznacza to, że w symulacjach reakcji chemicznych, konieczne jest użycie metod kwantowych, które są jednak zbyt kosztowne, aby symulować tak duży układ jak enzym. Kompromisem, pomiędzy dokładnością jaką dają metody kwantowe, a szybkością jaką dają metody oparte na polach siłowych, są metody hybrydowe — mechaniki kwantowej/mechaniki molekularnej (QM/MM) oraz mechaniki kwantowej/dynamiki molekularnej (QM/MD). Dzielą one układ na obszar kwantowy (QM) oraz obszar opisywany mechaniką molekularną (MM). Obszar QM obejmuje część, w której zachodzi reakcja chemiczna, ewentualnie z najbliższym otoczeniem (zwykle jest to substrat związany w centrum aktywnym i reszty zaangażowane bezpośrednio w reakcję). Pozostała część układu opisywana jest polem siłowym. Jeśli granica podziału przecina wiązania chemiczne, to są one wysycane tak zwanymi *link-atoms* — zwykle są to atomy wodoru. Hamiltonian układu QM/MM:

$$H = H_{QM} + H_{MM} + H_{QM/MM} \quad (1.7)$$

zawiera człon odpowiadający części kwantowej (H_{QM}), człon odpowiadający części klasycznej (H_{MM}) oraz człon hybrydowy ($H_{QM/MM}$) opisujący wpływ ładunków punktowych na atomach w części klasycznej na rozkład ładunku w części kwantowej oraz wkład oddziaływania atomów w części kwantowej z atomami w części klasycznej. Jest to zatem człon opisujący oddziaływanie pomiędzy częścią QM i MM. Metoda QM/MM była między innymi stosowana w symulacjach reakcji katalizowanej przez mutazę choryzmianową.^{31, 73, 74, 75, 76, 77} Symulacje metodą QM/MM sprowadzają się zwykle do wyznaczenia współrzędnej reakcji, a następnie optymalizacji geometrii całego układu dla kolejnych, zamrożonych, wartości tej współrzędnej, co daje profil energetyczny reakcji. Czasem dla każdego punktu na ścieżce reakcji wykonuje się symulację metodą dynamiki molekularnej, co pozwala wyznaczyć profil energii swobodnej* na ścieżce reakcji (jest to tak zwana metoda *umbrella sampling*). Możliwe jest również symulowanie całej ścieżki reakcji w ramach dynamiki molekularnej sprzężonej z dynamiką *ab initio* lub dynamiką Cara-Parrinello,^{78, 79} przy czym zwykle konieczne jest nałożenie na układ więzów, które ułatwiają przejście przez barierę, bo dla typowych reakcji chemicznych czas potrzebny na zaobserwowanie spontanicznej zachodzącej reakcji jest nieosiągalny. Ze względu na ograniczenia algorytmów i dostępnej mocy, symulacje ograniczają się zwykle do kilku nanosekund.

*Nie jest to jednak dokładnie termodynamiczna energia swobodna, gdyż jeden stopień swobody poostaje zawsze zamrożony



Rysunek 1.1: (a) Reakcja izomeryzacji choryzmianu do preferianu (przegrupowanie Claisena) katalizowana przez mutazę choryzmianową. (b) Numeracja atomów stosowana w choryzmianie.

Metody mechaniki molekularnej, dynamiki molekularnej oraz hybrydowe metody QM/MM i QM/MD posługują się — ze względu na ogromny koszt obliczeniowy — empirycznymi polami siłowymi, które przybliżają potencjał wiązań i oddziaływań niewiązących. Są to zwykle proste, empiryczne funkcje, takie jak potencjał oscylatora harmonicznego dla opisu wiązań czy też potencjał Lennarda-Jonesa, opisujący oddziaływania niewiązące. Oddziaływania o różnej naturze (elektrostatyczne, wymienne, indukcyjne, dyspersyjne itd.) wykazują odmienną zależność od odległości.⁷² Z tego względu racjonalny, teoretyczny opis natury oddziaływań, oparty na pierwszych zasadach, może znacznie ułatwić projektowanie uproszczonych modeli, takich jak pola siłowe.

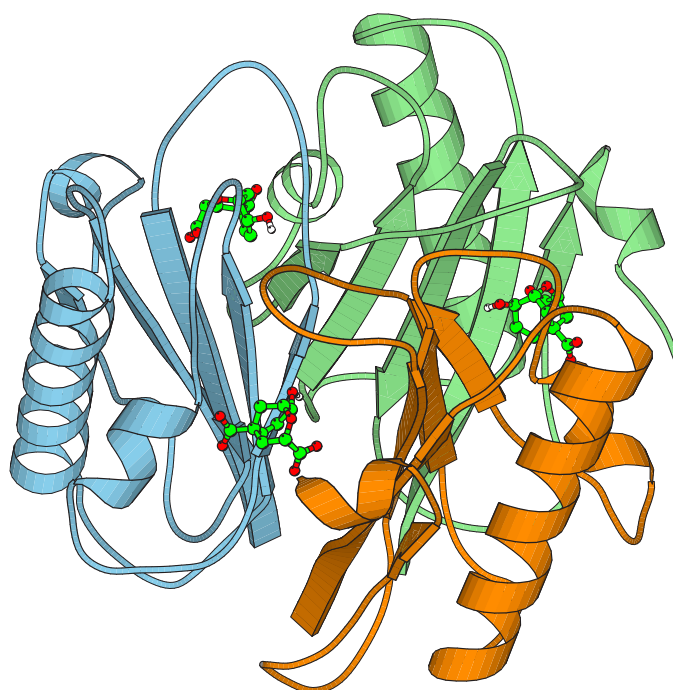
1.4 Mutaza choryzmianowa

Mutaza choryzmianowa (EC 5.4.99.5) jest enzymem, który katalizuje reakcję przegrupowania Claisena choryzmianu do preferianu (rysunek 1.1). Jest to jeden z etapów w syntezie aminokwasów aromatycznych — tyrozyny i fenyloalaniny u bakterii, grzybów i roślin wyższych.

Katalizowana reakcja jest stosunkowo prosta, ma tylko jeden substrat i produkt, a co więcej zachodzi również w roztworze wodnym, co pozwala na porównanie z reakcją niekatalizowaną. Struktura enzymu jest dobrze poznana (rysunek 1.2) — dostępnych jest wiele sekwencji

dla różnych organizmów i kilka struktur krystalograficznych, zdeponowanych w Protein Data Bank (PDB). Są to między innymi: mutaza choryzmianowa z bakterii *Bacillus subtilis*⁸⁰ i *Escherichia coli*⁸¹ oraz drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.⁸² Z tego względu, poświęca się jej wiele prac naukowych, zarówno eksperymentalnych,^{53,50,83,84,85} jak i teoretycznych.^{31,86,68,87,88,89,90,91,73,74,28,92,61,76,75,93,77,34} Mutaza choryzmianowa przyspiesza reakcję względem roztworu wodnego około 10^6 razy (obniża barierę względem reakcji w roztworze o $\Delta\Delta G^\ddagger$ o 9.1 kcal/mol). Entalpia swobodna aktywacji ΔG^\ddagger w enzymie wynosi 15.4 kcal/mol, natomiast energia aktywacji ΔH^\ddagger wynosi 12.7 kcal/mol,⁸³ a zatem wkład entropowy $T\Delta S$ wynosi około -2.7 kcal/mol, czyli mniej niż dwie dziesiąte entalpii swobodnej aktywacji. Entropia z reguły nie jest istotnym źródłem aktywności katalitycznej,⁹⁴ a ponadto jest dość trudna do uwzględnienia w zaawansowanych obliczeniach *ab initio* (ze względu na koszt obliczeniowy), dlatego w nie jest ona roważana w niniejszej pracy.

Z wyżej wymienionych powodów, enzym ten często wykorzystywany jest do testowania nowych technik obliczeniowych. Liczne badania reakcji katalizowanej przez mutazę choryzmianową metodą QM/MM na poziomie półempirycznym^{31,75,87,73,34} oraz *ab initio*^{77,89,74,76} wskazują na duży udział stabilizacji stanu przejściowego, jako głównego czynnika obniżającego barierę aktywacji, a wnioski te znajdują potwierdzenie w pracach eksperymentalnych.^{50,51,52,85} Badania reakcji katalizowanej przez mutazę choryzmianową metodami teoretycznymi zostały zapoczątkowane co najmniej dziesięć lat temu,³¹ jednak mimo to, wciąż trwa dyskusja na temat własności katalitycznych tego enzymu i natury obserwowanych efektów. Już w pierwszych pracach teoretycznych, w których symulowano reakcję zachodzącą w mutazie choryzmianowej z *B. subtilis* metodą QM/MM, stosując półempiryczną metodę AM1 do opisu części QM³¹ (metodę QM/MM opisano w rozdziałach 1.3 i 2.1) zwrócono uwagę na rolę naprężenia substratu i stabilizację stanu przejściowego przez dodatkowo naładowane reszty: argininę Arg90 oraz glutaminian Glu78. Również Lee i współpracownicy, w symulacji QM/MM pokazali,⁷⁴ że obserwowane efekty katalityczne wynikają z różnicowej stabilizacji stanu przejściowego względem choryzmianu przez reszty znajdujące się w centrum aktywnym — argininy Arg7, Arg63, Arg90 oraz glutaminian Glu78. Wyniki te zostały potwierdzone⁷⁶ w symulacjach na wyższym poziomie teorii (DFT) i z uwzględnieniem reszt Glu78 i Arg90 w części QM obliczeń QM/MM. Obniżenie bariery aktywacji oszacowane w tych obliczeniach (8.5 kcal/mol) różni się tylko nieznacznie od wartości eksperymentalnej cytowanej powyżej i wynika ze stabilizacji stanu przejściowego. Na drodze ukierunkowanej mutagenезы udowodniono⁵³ udział dodatnio naładowanej argininy Arg7 w stabilizacji stanu przejściowego. W podobny sposób wykazano rolę argininy Arg90.^{53,85,95} Wymiana tej reszty na dodatnio naładowaną lizynę obniża aktywność tylko częściowo, natomiast wymiana na alaninę pozbawia enzym aktywności całkowicie. Wskazuje to na istot-



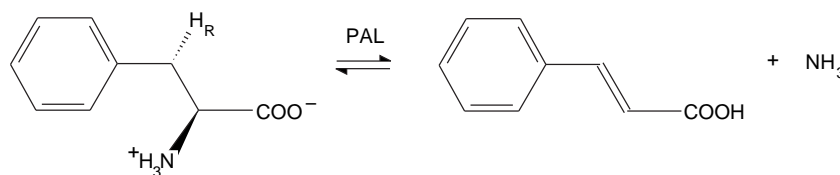
Rysunek 1.2: Struktura mutazy choryzmianowej z *Bacillus subtilis*. Enzym ten jest homotrimerem — poszczególne podjednostki zaznaczono różnymi kolorami. W centrach aktywnych znajdujących się pomiędzy monomerami, związany jest inhibitor.

ną rolę dodatnio naładowanego otoczenia katalitycznego w pobliżu atomów O3 i O5. Nie jest jasna rola glutaminianu Glu78. Wymiana tej reszty na alaninę lub glutaminę^{53,50} zmniejsza aktywność ponad 10^4 razy, natomiast wymiana na asparaginian powoduje dwukrotne obniżenie stałej k_{cat} i piętnastokrotne zwiększenie K_m , co w efekcie powoduje około trzydziestokrotne zmniejszenie wydajności. Badania ukierunkowanej mutagenozy⁵² wykazują również ogromne znaczenie dodatnio naładowanego otoczenia atomów O3, O4 i O5 w przypadku mutazy choryzmianowej z *E. coli*. W tym enzymie rolę argininy Arg90 pełni lizyna Lys39 — wymiana tego aminokwasu na inny, obojętny, również znacznie ($10^4 - 10^5$ razy) obniża aktywność enzymu.

Wielu badaczy wskazuje również na istotny udział efektów związanych wyborem odpowiedniej konformacji substratu.^{96,37,28,61,34} Podkreślają oni istnienie dwóch konformerów choryzmianu — diekwatorialnego oraz diaksjalnego.^{87,96,61,92} Według Guo i współpracowników⁹⁶ zarówno w fazie gazowej jak i w roztworze, stabilną formą jest konformer diekwatorialny, a populacja konformeru diaksjalnego jest skrajnie mała. Stwierdzili oni również, że enzym jest w stanie związać konformer nieaktywny i przekształcić go w formę aktywną. Według Jorgensena i współpracowników^{97,37} populacja konformacji NAC (która jest jednocześnie formą diaksjalną) wynosi 1% w fazie gazowej, 82% w wodzie i 100% w enzymie, co prowadzi do zupełnie przeciwnych wniosków: enzym może z powodzeniem wiązać konformery diaksjalne, które występują w otoczeniu, natomiast konwersja w centrum aktywnym praktycznie nie zachodzi. Stosunek liczości formy diaksjalnej do diekwatorialnej badano również eksperymentalnie, metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego⁹⁸ (NMR) i stwierdzono, że w roztworze wodnym populacja konformeru diaksjalnego wynosi 12%. Jeszcze wyraźniej udział efektów związanych z NAC został zaakcentowany w pracach zespołu prof. Bruice'a, który pokazuje, że własności katalityczne mutazy choryzmianowej są w większości zdominowane przez efekt reaktywnego konformeru.^{35,36,38,39,99} Prace te, spotkały się z krytyką innych badaczy zajmujących się mutazą choryzmianową.^{28,34,40} Niewątpliwie, czynniki konformacyjne ogrywają rolę w katalizie, jak pokazano to wielokrotnie,^{31,87,96,75,77,61,37} jednak kontrowersyjną wydaje się opinia prezentowana w niektórych pracach Bruice'a,⁹⁹ według którego stabilizacja stanu przejściowego nie jest istotna w przypadku mutazy choryzmianowej. Wkład efektu NAC został oszacowany dla tego enzymu teoretycznie^{40,30} na 3.8 do 4.6 kcal/mol lub 5 kcal/mol co stanowi około połowy całkowitego obniżenia bariery aktywacji przy przejściu z roztworu do enzymu (wartość eksperymentalna⁸³ $\Delta\Delta G^\ddagger = 9.1$ kcal/mol).

Dyskusja, która rozgorzała w literaturze na temat efektu NAC, obejmuje nie tylko mutazę choryzmianową, ale również inne enzymy.^{100,101,102,48} Uważa się, że efekt NAC odgrywa istotną rolę w przypadku *O*-metylotransferazy katecholu,¹⁰⁰ natomiast w przypadku dehalogenazy haloalkanowej wykazano, że odgrywa on niewielką rolę.³⁰

Warto również wspomnieć, że Martí i współpracownicy zwrócili uwagę⁷³



Rysunek 1.3: Reakcja eliminacji cząsteczki amoniaku z (S)-fenyloalaniny, katalizowana przez amoniakoliazę fenyloalaninową (PAL).

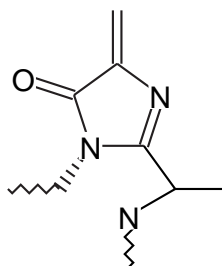
na istnienie dwóch możliwych ścieżek reakcji, z protonem H4 zwróconym do wewnątrz lub na zewnątrz pierścienia. Ścieżką preferowaną w centrum aktywnym enzymu jest reakcja przechodząca przez stan przejściowy z protonem H4 zwróconym na zewnątrz, który jest stabilizowany o 7.7 kcal/mol silniej, niż konformer z protonem H4 skierowanym do wewnątrz. Ma to pewne znaczenie dla rozważanego w niniejszej pracy wpływu konformacji grupy hydroksylowej OH4 choryzmianu. Chociaż grupa ta nie bierze udziału w reakcji, to ma wpływ na własności katalityczne enzymu, gdyż eksperymentalnie stwierdzono zmianę zmianę przyspieszenia względem reakcji niekatalizowanej (k_{cat}/k_{uncat}) z 10^6 na 10^2 w wyniku użycia substratu pozbawionego tej grupy.¹⁰³

Własności katalityczne mutazy choryzmianowej badano również mierząc⁶⁰ i obliczając teoretycznie^{61, 62, 63, 64} kinetyczne efekty izotopowe (KIE). Obliczenia KIE oraz równowagowych efektów izotopowych (EIE) wykazały,⁶³ że uwzględnienie w obliczeniach arginin 7, 63, 90 i 116 ma istotny wpływ na wartość efektów KIE i EIE drugiego rzędu (wymiana protonu przy atomie C oraz C9 na tryt), podczas gdy uwzględnianie kolejnych reszt nie powoduje żadnych zmian.

1.5 Amoniakoliza fenyloalaninowa

Amoniakoliza fenyloalaninowa, w skrócie PAL (EC 4.1.3.5) jest enzymem pochodzenia roślinnego (choć występuje również w drożdżach). Katalizuje ona reakcję eliminacji amoniaku z cząsteczki (S)-fenyloalaniny, w której powstaje kwas (E)-cynamonowy¹⁰⁴ (rysunek 1.3). Produkt ten jest prekursorem wielu związków istotnych dla funkcjonowania roślin, takich jak na przykład ligniny i flawonoidy. Z tego względu duże zainteresowanie budzą inhibitory PAL, które mogą być stosowane jako herbicydy, a także spełniają rolę w badaniach funkcjonowania tego enzymu.

Do niedawna nie były dostępne żadne struktury przestrzenne białka, ale ostatnio Calabrese i współpracownicy opublikowali i udostępnili strukturę enzymu PAL wyizolowanego z drożdży *Rhodospiridium toruloides*.¹⁰⁵ W dotychczasowych badaniach używano struktur otrzymanych na drodze modelowania przez homologię,^{104, 71, 106} jako że struktura pokrewnej amoniakolizy



Rysunek 1.4: 3,5-dihydro-5-metylideno-4*H*-imidazol-4-on, grupa prostetyczna amoniakolizazy fenyloalaninowej.

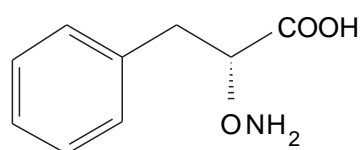
histydyny (HAL) jest dostępna od dawna.¹⁰⁷

W obu amoniakolizazach występuje ciekawa grupa prostetyczna — 3,5-dihydro-5-metylideno-4*H*-imidazol-4-on (MIO), która powstaje w wyniku posttranslacyjnej modyfikacji trzech aminokwasów: dehydratacji seryny Ser203 i kondensacji sąsiadującej z nią alaniny oraz glicyny, z utworzeniem pięciocłonowego pierścienia^{108,104} (rysunek 1.4). W jednym z proponowanych dla PAL mechanizmów reakcji,¹⁰⁴ fenyloalanina wiąże się z grupą metylidenową, co niszczy strukturę aromatyczną pierścienia fenylowego i prowadzi do karbokationu. Dzięki temu zasada Lewisa może łatwo oderwać proton H_R . W kolejnym etapie odchodzi grupa $-NH_3$ i tworzy się wiązanie podwójne pomiędzy atomami C2 i C3. Drugi proponowany mechanizm¹⁰⁵ również zakłada udział grupy MIO, jednak to grupa $-NH_2$ fenyloalaniny atakuje grupę metylidenową MIO, tworzy się wiązanie pomiędzy fenyloalaniną a MIO, a następnie zasada Lewisa powoduje oderwanie protonu H_R . Dopiero teraz tworzy się wiązanie podwójne między C2, a C3 i zrywa się wiązanie pomiędzy C2 i grupą $-NH_2$.

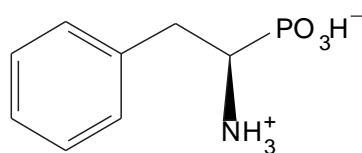
Spośród znanych inhibitorów PAL warto wymienić kwas 2-aminooksy-3-fenylopropanowy,¹⁰⁹ który jest najsilniejszym inhibitorem PAL (jego stała inhibicji PAL z gryki wynosi $0.0014 \mu M$) oraz kwas 1-amino-2-fenyletylofosfonowy o stałej inhibicji PAL z gryki $1.5 \mu M$, który jest analogiem substratu¹¹⁰ (rysunek 1.5). Najsilniejszym inhibitorem PAL *in vivo* jest kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy,¹¹¹ AIP (rysunek 1.5), choć jego stała inhibicji jest mniejsza niż w przypadku kwasu 2-aminooksy-3-fenylopropanowego (wynosi $0.08 \mu M$ w przypadku PAL z gryki).

1.6 Przeniesienie ładunku w układach biologicznych

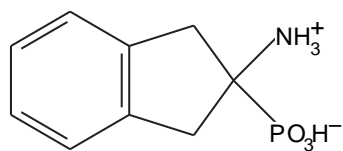
Przeniesienie ładunku (CT) jest zjawiskiem polegającym na przepływie elektronów z jednego monomeru do drugiego lub też przepływie elektronów po-



A



B



C

Rysunek 1.5: Wybrane inhibitory amoniakolizy fenyloalaninowej: kwas 2-aminooksy-3-fenylpropanowy (A), kwas 1-amino-2-fenyletylofosfonowy (B), kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (C).

między różnymi fragmentami układu. W przypadku, gdy fragmenty te nie są kowalencyjnie związane, mówi się o międzycząsteczkowym przeniesieniu ładunku. W celach obliczeniowych można je zdefiniować jako różnicę pomiędzy formalnym ładunkiem wybranego monomeru, a jego ładunkiem rzeczywistym. W układach białkowych może to być różnica pomiędzy formalnym, a rzeczywistym ładunkiem reszty lub w sytuacji gdy badane jest przeniesienie ładunku wywołane oddziaływaniem liganda z wybraną resztą, można je zdefiniować jako różnicę sumarycznego ładunku reszty izolowanej oraz w kompleksie z ligandem.

Zjawisko przeniesienia ładunku ma ogromne znaczenie w układach enzymatycznych.¹¹² Może o tym świadczyć liczba publikacji, jakie ukazują się na ten temat. Według bazy *ISI Science Citation Index* jest to 2725 publikacji w ciągu ostatnich 10 lat.* Przeniesienie ładunku pełni ważną rolę w enzymach takich jak na przykład proteazy, w których zmiany rozkładu ładunku na atomach tak zwanej triady katalitycznej są istotne z punktu widzenia katalizy.^{113,114} Zwykle w symulacjach reakcji chemicznych zakłada się pewien rozkład ładunku na resztach — w metodach mechaniki molekularnej jest on z konieczności ograniczony do wartości całkowitych. Poszczególne reszty mają całkowity ładunek równy -1 , 0 lub $+1$, a ładunki punktowe są zdefiniowane przez typ atomu i reszty, na podstawie pola siłowego. W metodach takich jak QM/MM uwzględnia się pewną część gęstości elektronowej w obliczeniach i wówczas ładunki punktowe oblicza się, stosując jedną z kilku popularnych metod (są one wymienione w rozdziale 2.7) — najczęściej jest to analiza populacyjna Mullikena.¹¹⁵ Właśnie w ten sposób badano przeniesienie ładunku w mutacji choryzmianowej.^{74,76} Zaobserwowano, że w trakcie reakcji następuje przepływ ładunku z argininy Arg90 na atom tlenu O3 oraz z glutaminianu Glu78 na grupę hydroksylową w choryzmianie. Ponadto, uwzględnienie tych reszt w części kwantowej obliczeń QM/MM radykalnie zmienia ładunek argininy z formalnego ładunku $+1 e$, jaki stosowany jest w klasycznych obliczeniach na ładunek $+0.66 e$ wynikający z sumowania ładunków punktowych na atomach obliczonych metodą Mullikena. Podobnie, dla glutaminianu ładunek ten zmienia się z $-1 e$ do $-0.67 e$.

Błąd superpozycji bazy funkcyjnej wynikający z nierównomiernego rozkładu funkcji pomiędzy monomerami, może czasem prowadzić do niefizycznego przepływu ładunku. Efekt ten obserwowano w małych układach modelowych¹¹⁶ oraz w modelu centrum aktywnego leucyloaminopeptydazy.¹¹⁷

*Szukano publikacji zawierających słowo kluczowe *enzyme* i frazę *charge transfer* lub *electron transfer*; w tym celu użyto wyrażenia *enzyme and (charge transfer or electron transfer)*.

1.7 Cel pracy

Niniejsza praca ma zarówno cel poznawczy, jak i metodologiczny. Autor, stosując dostępne metody chemii obliczeniowej oraz nowe metody, opracowane w Zakładzie Modelowania Molekularnego Politechniki Wrocławskiej i rozwinięte w trakcie realizacji pracy, pragnie zbadać naturę oddziaływań i efektów katalitycznych w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej, a także dowiedzieć się w jaki sposób enzym ten obniża barierę aktywacji w reakcji przegrupowania choryzmianu do preferianu. Do tej pory, wszelkie badania teoretyczne mutazy choryzmianowej ograniczały się do podejścia supermolekularnego, w którym enzym traktowany był jako całość i nie wykraczały poza poziom metody DFT, a zatem nie uwzględniały poprawnie oddziaływań natury dyspersyjnej. Odpowiedzi na te pytania, mogą wnieść wkład w wyjaśnienie wątpliwości dotyczących mechanizmu działania mutazy choryzmianowej — w szczególności roli stabilizacji stanu przejściowego i NAC oraz udziału efektów dynamicznych. Drugim aspektem poznawczym niniejszej pracy są badania mechanizmu inhibicji amoniakolizy fenyloalaninowej. Badania inhibitorów wiążących się w centrum aktywnym pozwalają także uzyskać cenne informacje o mechanizmach reakcji enzymatycznych.

Celem pracy jest również rozwój skutecznej metodologii służącej do badania statycznych i dynamicznych efektów katalitycznych w enzymach oraz, przede wszystkim, metod pozwalających na projektowanie katalizatorów dla zadanych reakcji chemicznych. Przyjęto, że powinny być to proste metody pozwalające na szybkie wskazanie optymalnego otoczenia katalitycznego dla reakcji, które następnie mogłoby być precyzyjnie zbadane za pomocą dokładniejszych metod. Opracowane metody, są uniwersalne — ich zastosowanie nie jest ograniczone wyłącznie do projektowania katalizatorów enzymatycznych i możliwe jest na przykład badanie zeolitów,^{118,119} czy kwasów nukleinowych.¹²⁰ Innym aspektem metodologicznym, zbadanym w ramach tej pracy, jest dobór optymalnej metody do wyznaczania międzycząsteczkowego przeniesienia ładunku, po to by móc prawidłowo ocenić efekty przeniesienia ładunku wewnątrz centrów aktywnych.

Rozdział 2

Metodyka badań

2.1 Obliczenia QM/MM

W obliczeniach oddziaływań w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej oraz obliczeniach pól katalitycznych, posługiwano się strukturami substratu (choryzmianu) i stanu przejściowego, pochodzącymi z obliczeń QM/MM. Głównym wykonawcą tych obliczeń była Kara R. Ranaghan z Uniwersytetu w Bristolu.⁷⁷ Polegały one na symulowaniu reakcji przebiegającej w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej w programie CHARMM¹²¹ (wersja 27a1) w połączeniu z programem GAMESS-US.^{122,123} Część kwantowa (QM) obejmowała jedynie substrat natomiast część klasyczna (MM) zawierała wyłącznie atomy enzymu. Taki podział jest o tyle wygodny, że nie wymaga przeprowadzenia granicy podziału (QM/MM) przez wiązania kowalencyjne, a co za tym idzie — nie wymaga stosowania sztucznych atomów wysycających przerwane wiązania. Do obliczeń w części MM stosowano pole siłowe CHARMM22.¹²⁴ Struktura enzymu, pobrana z bazy PDB (rekord 2CHT⁸⁰) zawierała pierwotnie inhibitor-analog stanu przejściowego związany w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej z *Bacillus subtilis*. Został on zastąpiony cząsteczką choryzmianu zoptymalizowaną w fazie gazowej (metodą HF/6-31G(d)), a do atomów białka dodano wodory. W przypadku reszt, które mogą występować w różnych stanach protonacji, dobrano taki stan jaki odpowiada pH = 7 biorąc również pod uwagę położenie reszty i jej dostępność dla rozpuszczalnika. Cztery argininy, glutaminian i lizyna (Arg7, Arg63, Arg90, Arg116, Glu78, Lys60) znajdujące się w centrum aktywnym były zjonizowane. Symulacje dotyczyły wyłącznie jednego centrum aktywnego znajdującego się pomiędzy łańcuchami A i B (w mutazie choryzmianowej znajdują się trzy jednakowe centra aktywne). Położenie dobudowanych atomów wodoru zostało zoptymalizowane w 500 krokach metodą najszybszego spadku (SD). Następnie, dodano cząsteczki wody poprzez nałożenie sześciennego kostki o boku 30 Å zawierającej 8000 cząsteczek wody TIP3P, uprzednio poddanych symulacji MD. Z całego układu, do dal-

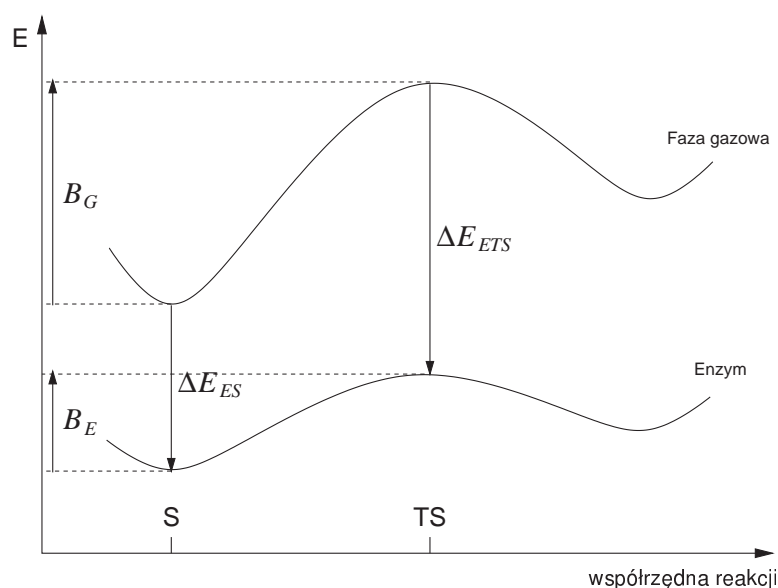
szych obliczeń pozostawiono jedynie sferę 25 Å wokół atomu C5 substratu; wszystkie reszty, które miały co najmniej jeden ciężki atom wewnątrz tej sfery, pozostawiono w całości. Usunięto również cząsteczki wody znajdujące się zbyt blisko atomów białka, jako kryterium przyjęto odległość pomiędzy atomem tlenu w cząsteczce wody i atomem ciężkim białka, mniejszą niż 2.8 Å. Położenie cząsteczek wody zostało zoptymalizowane metodą MM w 500 krokach SD i 1500 krokach zmodyfikowaną metodą Newtona-Raphsona (ABNR) a następnie poddane krótkiej symulacji MD (85 ps). W tych i dalszych obliczeniach stosowano promień odcięcia równy 25 Å. Aby zapobiec „wyparowaniu” wody w trakcie optymalizacji, na cząsteczki rozpuszczalnika nałożono sferyczny potencjał o promieniu 25 Å.¹²⁵ Dodatkowo, na atomy enzymu położone w przedziale odległości 21 do 25 Å od środka sfery nałożono dodatkowe więzy, skalowane ze wzrostem promienia, a naładowane reszty w tym obszarze zostały zneutralizowane. Następnie zoptymalizowano geometrię całego układu z zamrożonym substratem (1000 kroków SD i 1143 kroki ABNR) oraz po odmrożeniu, metodą QM/MM, przy zastosowaniu metody HF i bazy funkcyjnej 6-31G(d) dla części QM (250 kroków ABNR). W obliczeniach QM/MM zamrożono dodatkowo atomy poza sferą 16 Å, a na atomy tlenu w cząsteczkach wody leżących w obszarze 10 do 16 Å nałożono więzy 5 kcal/mol·Å², natomiast nie stosowano już potencjału sferycznego.

Reakcję symulowano zmieniając wartość współrzędnej reakcji, która była zdefiniowana jako różnica długości wiązań C–O3 (zrywanego) i C3–C9 (tworzonego). Dla poszczególnych wartości w przedziale od –1.8 do 1.8 Å co 0.3 Å przeprowadzono optymalizację z dodatkowymi więzami zapewniającymi utrzymanie odpowiedniej wartości współrzędnej reakcji. Ze względu na koszt obliczeniowy znacznie przekraczający możliwości dostępnego sprzętu, optymalizację ograniczono do 10 kroków SD i 40 kroków metody ABNR. Dodatkowej optymalizacji w 10 krokach SD i 40 krokach ABNR poddano strukturę w maksimum energii potencjalnej, używaną w niniejszej pracy jako struktura kompleksu ze stanem przejściowym. Jest to struktura o współrzędnej reakcji –0.4 Å, natomiast dla substratu wartość współrzędnej reakcji wynosi –2.0 Å.

Dla zilustrowania złożoności tego rodzaju obliczeń warto dodać, że całe obliczenia QM/MM zajęły 117 godzin na 32 procesorach komputera Cray T3E (czyli na pojedynczym procesorze obliczenia te trwałyby co najmniej 156 dni).

2.2 Różnicowa stabilizacja stanu przejściowego

Metoda różnicowej stabilizacji stanu przejściowego, DTSS (rysunek 2.1), zaproponowana przez Sokalskiego¹²⁶ stanowi rozszerzenie idei stabilizacji stanu przejściowego, opierającej się na hipotezie Paulinga.⁴ Obniżenie bariery aktywacji definiuje się jako różnicę bariery dla reakcji katalizowanej (B_E)



Rysunek 2.1: Różnicowa stabilizacja stanu przejściowego.

oraz reakcji niekatalizowanej, zachodzącej w fazie gazowej (B_G):

$$\Delta = B_E - B_G \quad (2.1)$$

Obie bariery mają wartość większą od zera, więc jeśli katalizator E obniża barierę aktywacji, to $\Delta < 0$. Alternatywnie, Δ może być wyrażona za pomocą energii oddziaływania w kompleksie katalizator–stan przejściowy (ΔE_{ETS}) i energii oddziaływania w kompleksie katalizator–substrat (ΔE_{ES}), co odpowiada względnej stabilizacji stanu przejściowego:

$$\Delta = \Delta E_{ETS} - \Delta E_{ES} \quad (2.2)$$

W przypadku oddziaływań stabilizujących ΔE_{ETS} i ΔE_{ES} mają wartości ujemne. Metoda DTSS może być stosowana zarówno dla całego katalizatora jak i osobno dla każdego z jego fragmentów, czyli na przykład dla poszczególnych reszt wchodzących w skład centrum aktywnego enzymu (przy założeniu addytywności oddziaływań). Δ określa wówczas wkład danej reszty do całkowitego obniżenia bariery aktywacji lub też do stabilizacji stanu przejściowego względem substratu. Ujemna wartość Δ oznacza, że dana reszta obniża barierę; źródłem tego obniżenia, może być albo większa stabilizacja stanu przejściowego względem substratu albo większa destabilizacja substratu względem TS.

W metodzie DTSS definiuje się stabilizację stanu przejściowego względem reakcji odniesienia w fazie gazowej. W wielu symulacjach bada się efekty katalityczne względem reakcji zachodzącej w wodzie. Warshel twierdzi,^{127,94}

że odnoszenie się do fazy gazowej jest niepoprawne, jednak ze względu chociażby na organizację rozpuszczalnika w odpowiedzi na rozkład gęstości elektronowej substratu,²⁹ rozpuszczalnik staje się różnym otoczeniem dla różnych substratów. Z tych powodów badania polegające na porównaniu oddziaływań różnych substratów z katalizatorem mogą być zafałszowane przez wpływ rozpuszczalnika i dlatego lepszym punktem odniesienia jest próżnia. Wiele reakcji zachodzi również w rozpuszczalnikach niewodnych, a ponadto, pewne reakcje mogą przebiegać w rozpuszczalniku według odmiennego mechanizmu, ponieważ stanowi on zupełnie inne środowisko niż enzym. Jak pokazał Dewar,¹²⁸ lepszym punktem odniesienia dla opisu reakcji enzymatycznej może być mechanizm w fazie gazowej.

2.3 Oddziaływania międzycząsteczkowe

Podobnie jak w opisie wiązania chemicznego, tak i w opisie oddziaływań międzycząsteczkowych, chemicy chętnie stosują pewne podziały i klasyfikacje. Określenie typu i nazwanie wiązania chemicznego lub oddziaływania pozwala na przypisanie pewnych ogólnych własności i charakteru badanemu układowi na podstawie zgromadzonej wiedzy. Pomimo, że natura oddziaływań dla różnych typów kompleksów jest złożona (nie ma kompleksów molekularnych z oddziaływaniami wyłącznie elektrostatycznymi, czy też wyłącznie dyspersyjnymi), to jednak zastosowanie odpowiedniej klasyfikacji umożliwia powiązanie charakteru oddziaływań międzycząsteczkowych z właściwościami kompleksów, przewidywanie tych właściwości oraz racjonalne i systematyczne generowanie bardziej przybliżonych metod opisu oddziaływań międzycząsteczkowych.

Systematyczny opis oddziaływań międzycząsteczkowych jest możliwy w ramach polaryzacyjnego rachunku zaburzeń oraz rachunku zaburzeń o adaptowanej symetrii¹²⁹ (SAPT). Polaryzacyjny rachunek zaburzeń nie pozwala na uwzględnienie wszystkich składowych (na przykład zaniedbuje bardzo ważne składowe wymienne), dlatego konieczne jest stosowanie bardziej złożonych metod, takich jak SAPT. To, co sprawia, że opis w ramach SAPT czy też bardziej zaawansowanej teorii podwójnego zaburzenia¹²⁹ jest atrakcyjny, to fakt, że wszystkie oddziaływania można przedstawić jako kolejne składowe nieskończonej sumy, której kolejne elementy wnoszą coraz mniejszy (zwykle) wkład, i którą można w pewnym miejscu „uciąć”, tworząc przybliżony opis oddziaływania.

Dla potrzeb niniejszej pracy konieczne jest zdefiniowanie pojęcia energii oddziaływania międzycząsteczkowego (ΔE): jest to różnica energii całego kompleksu ($E_{ABC\dots}$) oraz energii izolowanych monomerów (E_A , E_B , E_C , ...):

$$\Delta E(\mathbf{R}) = E_{ABC\dots}(\mathbf{R}) - [E_A(\mathbf{R}) + E_B(\mathbf{R}) + \dots] \quad (2.3)$$

gdzie \mathbf{R} jest wektorem położenia jąder atomowych. Wszystkie wartości energii

w powyższym równaniu liczone są przy takich samych położeniach jąder, czyli bez relaksacji monomerów. W dalszej części pracy rozważania zostaną ograniczone do dimeru $A + B$.

W polaryzacyjnym rachunku zaburzeń oddziaływanie jest traktowane jako zaburzenie, a kolejne poprawki do energii są składowymi energii oddziaływania.¹²⁹ Niezaburzona funkcja falowa jest iloczynem funkcji falowych monomerów:

$$\Psi_0 = \Psi_A \Psi_B \quad (2.4)$$

a n -ta poprawka do energii oddziaływania ma postać:

$$\Delta E_{pol}^{(n)} = \frac{\langle \Psi_0 | V | \Psi_{pol}^{(n-1)} \rangle}{\langle \Psi_0 | \Psi_{pol}^{(n-1)} \rangle} \quad (2.5)$$

gdzie V jest operatorem zaburzenia, a $\Psi_{pol}^{(n-1)}$ jest $n - 1$ poprawką do funkcji falowej. W szczególności, pierwsza poprawka do energii oddziaływania to oddziaływanie elektrostatyczne ($\Delta E_{el}^{(1)}$) pomiędzy niezaburzonymi rozkładami ładunku monomerów:

$$\Delta E_{pol}^{(1)} \equiv \Delta E_{el}^{(1)} = \frac{\langle \Psi_0 | V | \Psi_0 \rangle}{\langle \Psi_0 | \Psi_0 \rangle} \quad (2.6)$$

Druga poprawka do energii oddziaływania, $\Delta E_{pol}^{(2)}$, zawiera składowe — indukcyjną i dyspersyjną, wynikające z wzajemnego oddziaływania monomeru niezaburzonego z zaburzonym (składowa indukcyjna) oraz oddziaływania monomerów zaburzonych (składowa dyspersyjna).

Wadą polaryzacyjnego rachunku zaburzeń jest brak antysymetryzowanej funkcji falowej Ψ_0 uwzględniającej możliwość międzycząsteczkowej wymiany elektronów wynikającej z zakazu Pauliego. To sprawia, że energia oddziaływania obliczona w rachunku polaryzacyjnym, źle opisuje oddziaływanie krótko zasięgowe (jest zaniżona), ponieważ nie uwzględnia odpychającej składowej wymiennej, której udział gwałtownie rośnie na małych odległościach. Jednak uwzględnienie funkcji falowej o poprawnej symetrii ($\hat{\mathcal{A}}\Psi_0$, gdzie $\hat{\mathcal{A}}$ jest operatorem antysymetryzacji) nie jest możliwe w ramach rachunku zaburzeń Rayleigha-Schrödingera, ponieważ nie jest ona funkcją własną operatora H_0 . Zastosowanie funkcji falowej o takiej postaci jest natomiast możliwe w rachunku zaburzeń o adaptowanej symetrii (SAPT).¹²⁹ W tej metodzie, poszczególne poprawki zawierają część polaryzacyjną i wymienną:

$$\Delta E^{(n)} = \Delta E_{pol}^{(n)} + \Delta E_{ex}^{(n)} \quad (2.7)$$

Poprawka pierwszego rzędu, która ma postać:

$$\Delta E^{(1)} = \frac{\langle \hat{\mathcal{A}}\Psi_0 | V | \hat{\mathcal{A}}\Psi_0 \rangle}{\langle \hat{\mathcal{A}}\Psi_0 | \hat{\mathcal{A}}\Psi_0 \rangle} \quad (2.8)$$

składa się z części elektrostatycznej ($\Delta E_{el}^{(1)}$) oraz wymiennej ($\Delta E_{ex}^{(1)}$):

$$\Delta E^{(1)} = \Delta E_{el}^{(1)} + \Delta E_{ex}^{(1)} \quad (2.9)$$

i jest równa energii oddziaływania Heitlera-Londona (ΔE_{HL}).⁷² Część polaryzacyjna poprawki drugiego rzędu ($\Delta E_{pol}^{(2)}$) zawiera składową indukcyjną ($\Delta E_{ind}^{(2)}$) i dyspersyjną ($\Delta E_{dysp}^{(2)}$) natomiast część wymienna ($\Delta E_{ex}^{(2)}$) zawiera składową wymiennie-indukcyjną ($\Delta E_{ex-ind}^{(2)}$) oraz wymiennie-dyspersyjną ($\Delta E_{ex-dysp}^{(2)}$).

Do obliczania składowych energii oddziaływania opracowano wiele różnych schematów, z których jednym z najpopularniejszych jest schemat Kitaury-Morokumy.¹³⁰ W niniejszej pracy, zastosowano wariacyjno-perturbacyjny schemat dekompozycji energii oddziaływań opracowany przez Roszaka i Sokalskiego.^{131, 132, 133} Istotną zaletą implementacji tej metody autorstwa Roberta Góry¹³⁴ w porównaniu z innymi programami, jest wykorzystanie metody *Direct-SCF*, kiedy to całki nie są składowane na dysku w trakcie obliczeń SCF, lecz są obliczane w każdym cyklu od nowa, co umożliwia badanie znacznie większych układów molekularnych (aktualnie około 1700 orbitali atomowych). Szybkość obecnie dostępnych procesorów sprawia, że obliczenie potrzebnych całek zajmuje mniej czasu, niż wczytanie ich z dysku, co daje szybszy kod, a jednocześnie zmniejsza zapotrzebowanie na przestrzeń dyskową. W przypadku bardzo dużych układów (rzędu kilku tysięcy funkcji bazy) zastosowanie metody *Direct-SCF* staje się konieczne, a jednocześnie wyklucza użycie innych schematów dekompozycji wykorzystujących składowanie całek w pamięci dyskowej. Nowsza implementacja wspomnianego schematu dekompozycji umożliwia między innymi obliczanie efektów wielociałowych oraz podział składowej korelacyjnej (ΔE_{corr}) na dalsze składowe.^{135, 136}

W ramach wariacyjno-perturbacyjnego schematu podziału, energia oddziaływania może być rozłożona na składową Heitlera-Londona ($\Delta E_{HL} = \Delta E^{(1)}$), składową delokalizacyjną wyższych rzędów ($\Delta E_{del}^{(R)}$) oraz składową korelacyjną (ΔE_{corr}):

$$\Delta E = \Delta E_{HL} + \Delta E_{del}^{(R)} + \Delta E_{corr} \quad (2.10)$$

Składowa korelacyjna jest obliczana jako różnica pomiędzy energią oddziaływania uwzględniającą efekty korelacyjne, na przykład obliczoną metodą Møllera-Plesseta drugiego rzędu (ΔE^{MP2}), względnie metodą sprzężonych klasterów, a energią obliczoną na poziomie metody Hartree-Focka (ΔE^{SCF}):

$$\Delta E_{corr} = \Delta E^{MP2} - \Delta E^{SCF} \quad (2.11)$$

Składowa delokalizacyjna obliczana jest zgodnie z równaniem:

$$\Delta E_{del}^{(R)} = \Delta E^{SCF} - \Delta E_{HL} \quad (2.12)$$

Składową Heitlera-Londona (ΔE_{HL}) oblicza się według równania:

$$\Delta E^{(1)} = \frac{\langle \hat{\mathcal{A}}\Psi_A\Psi_B | \hat{H}_{AB} | \hat{\mathcal{A}}\Psi_A\Psi_B \rangle}{\langle \hat{\mathcal{A}}\Psi_A\Psi_B | \hat{\mathcal{A}}\Psi_A\Psi_B \rangle} - \frac{\langle \Psi_A | \hat{H}_A | \Psi_A \rangle}{\langle \Psi_A | \Psi_A \rangle} - \frac{\langle \Psi_B | \hat{H}_B | \Psi_B \rangle}{\langle \Psi_B | \Psi_B \rangle} \quad (2.13)$$

gdzie A , B i AB oznaczają odpowiednio monomery i dimer, \hat{H}_X oznacza hamiltonian dla $X (= A, B, AB)$, Ψ_X jest funkcją falową $X (= A, B, AB)$, a $\hat{\mathcal{A}}$ jest operatorem antysymetrii. Dodatkowo, składowa Heitlera-Londona może być podzielona na część elektrostatyczną pierwszego rzędu, $\Delta E_{el}^{(1)}$ oraz część wymienną pierwszego rzędu, $\Delta E_{ex}^{(1)}$ (równanie 2.9). Składową elektrostatyczną oblicza się wykorzystując rachunek polaryzacyjny (równanie 2.6):

$$\Delta E_{el}^{(1)} = \frac{\langle \Psi_A\Psi_B | \hat{H}_{AB} - \hat{H}_A - \hat{H}_B | \Psi_A\Psi_B \rangle}{\langle \Psi_A\Psi_B | \Psi_A\Psi_B \rangle} \quad (2.14)$$

natomiast składową wymienną oblicza się jako różnicę:

$$\Delta E_{ex}^{(1)} = \Delta E_{HL} - \Delta E_{el}^{(1)} \quad (2.15)$$

Wszystkie energie oddziaływań są obliczane w bazie funkcyjnej dimeru, co pozwala wyeliminować błąd superpozycji bazy funkcyjnej (BSSE), zgodnie ze schematem zaproponowanym przez Boysa i Bernardiego.¹³⁷ Dodatkowo, składowa elektrostatyczna może być podzielona na część multipolową ($\Delta E_{el\cdot mtp}^{(1)}$) i penetracyjną ($\Delta E_{el\cdot pen}^{(1)}$):

$$\Delta E_{el}^{(1)} = \Delta E_{el\cdot mtp}^{(1)} + \Delta E_{el\cdot pen}^{(1)} \quad (2.16)$$

Składowa multipolowa może być wyznaczona za pomocą metody skumulowanych momentów multipolowych (CAMM)^{138,139} bazującej na dowolnej gęstości elektronowej — na przykład uzyskanej metodą pola samouzgodnionego (SCF) metodą Møllera-Plesseta (MP), metodą funkcjonału gęstości (DFT) czy też metodą sprzężonych klastrów (CC) — albo równoważnej w przybliżeniu metody rozproszonej analizy momentów multipolowych (DMA).¹⁴⁰

Przedstawione składowe energii oddziaływania tworzą szereg modeli teoretycznych o różnym stopniu zaawansowania i złożoności obliczeniowej. Poprzez pominięcie odpowiedniej liczby składowych w poniższym równaniu otrzymuje się odpowiednio uproszczony model, o określonej skalowalności $O(X)$:

$$\begin{aligned}
 \Delta E &= \Delta E_{el\cdot mtp}^{(1)} + \Delta E_{el\cdot pen}^{(1)} + \Delta E_{ex}^{(1)} + \Delta E_{del}^{(R)} + \Delta E_{corr} \\
 O(N^5) &\underbrace{\hspace{10em}}_{\Delta E^{MP2}} \\
 O(N^4) &\underbrace{\hspace{10em}}_{\Delta E^{SCF}} \\
 O(N^4) &\underbrace{\hspace{10em}}_{\Delta E_{HL}} \\
 O(N^4) &\underbrace{\hspace{10em}}_{\Delta E_{el}^{(1)}} \\
 O(A^2) &\underbrace{\hspace{10em}}_{\Delta E_{el\cdot mtp}^{(1)}}
 \end{aligned} \tag{2.17}$$

gdzie N jest liczbą orbitali atomowych, natomiast A jest liczbą atomów. Jak widać na powyższym schemacie, złożoność obliczeniowa najbardziej zaawansowanego modelu (ΔE^{MP2}), uwzględniającego składową korelacyjną, rośnie z piątą potęgą liczby orbitali atomowych, natomiast złożoność najprostszego modelu ($\Delta E_{el\cdot mtp}^{(1)}$) zmienia się proporcjonalnie do kwadratu liczby atomów.

Podstawowym celem podziału energii oddziaływań na składowe jest chęć określenia typu oddziaływań występujących w badanym układzie i zrozumienie ich fizycznego charakteru. Wymienionym powyżej składowym można przypisać sens fizyczny: składowa Heitlera-Londona, ΔE_{HL} odpowiada oddziaływaniu statycznych (zamrożonych) rozkładów ładunku monomerów i dzieli się na dwie części: oddziaływanie elektrostatyczne (kulombowskie) tychże rozkładów ($\Delta E_{el}^{(1)}$) oraz wymienne ($\Delta E_{ex}^{(1)}$) — wynikające z zakazu Pauliego (a bezpośrednio — z uwzględnienia operatora antysymetrii, \hat{A}), czyli opisujące efekt czysto kwantowy. Składowa delokalizacyjna, $\Delta E_{del}^{(R)}$, obliczona w sposób opisany powyżej, opisuje oddziaływanie monomerów o zrelaksowanym rozkładzie ładunku (rozkładzie ładunku zdeformowanym w wyniku obecności drugiego monomeru) i zawiera efekty indukcyjne, indukcyjno-wymienne, *charge transfer* oraz deformacyjno-wymienne, nie uwzględnia natomiast oddziaływań dyspersyjnych, czyli efektów wynikających z oddziaływania zaburzonych rozkładów ładunku monomerów, ze względu na to, że mają one charakter korelacyjny. Ten komponent jest uwzględniany w powyższym rachunku jako składowa korelacyjna. Oprócz oddziaływań dyspersyjnych zawiera ona również korelacyjne przyczynki do oddziaływań elektrostatycznych, indukcyjnych i wymiennych. Składową elektrostatyczną $\Delta E_{el}^{(1)}$ można podzielić na część multipolową ($\Delta E_{el\cdot mtp}^{(1)}$), która daje się opisać w sposób klasyczny, to znaczy za pomocą ładunków punktowych, dipoli, kwadrupoli i tak dalej, oraz część penetracyjną, która określa różnicę pomiędzy

tym klasycznym opisem, a rzeczywistym, ciągłym rozkładem ładunku w monomerach.

Opisana w rozdziale 2.2 różnicowa stabilizacja stanu przejściowego, może być zastosowana nie tylko do całkowitych energii oddziaływań substrat–enzym oraz stan przejściowy–enzym, ale również do poszczególnych składowych energii oddziaływania. Dzięki temu możliwy jest podział energii Δ na fragmenty o różnej naturze:

$$\begin{aligned}
 \Delta &= \Delta_{el\cdot mtp}^{(1)} + \Delta_{el\cdot pen}^{(1)} + \Delta_{ex}^{(1)} + \Delta_{del}^{(R)} + \Delta_{corr} & (2.18) \\
 O(N^5) & \underbrace{\hspace{15em}}_{\Delta_{MP2}} \\
 O(N^4) & \underbrace{\hspace{15em}}_{\Delta_{SCF}} \\
 O(N^4) & \underbrace{\hspace{15em}}_{\Delta_{HL}} \\
 O(N^4) & \underbrace{\hspace{15em}}_{\Delta_{el}^{(1)}} \\
 O(A^2) & \underbrace{\hspace{15em}}_{\Delta_{el\cdot mtp}^{(1)}} \\
 O(A^1) & \Delta_{Vq} = \sum_i (V_i^{TS} - V_i^S) q_i^E & (2.19)
 \end{aligned}$$

Zastosowano tutaj oznaczenia analogiczne do stosowanych w przypadku energii oddziaływania: $\Delta_{el\cdot mtp}^{(1)}$ oznacza składową multipolową, $\Delta_{el\cdot pen}^{(1)}$ – składową penetracyjną, $\Delta_{ex}^{(1)}$ – składową wymienną, $\Delta_{del}^{(R)}$ – składową delokalizacyjną, a Δ_{corr} – składową wymienną. $\Delta_{el}^{(1)}$ to obniżenie bariery aktywacji wyznaczone na poziomie pierwszej poprawki w rachunku polaryzacyjnym, Δ_{HL} – na poziomie pierwszej poprawki w ramach SAPT, Δ_{SCF} – na poziomie metody Hartree-Focka, a Δ_{MP2} – na poziomie metody Møllera-Plesseta drugiego rzędu. Całkowite obniżenie bariery aktywacji Δ_{Vq} jest obliczane według klasycznego modelu Coulombowskiego — jako suma iloczynów ładunków i -tej reszty i różnicowych potencjałów elektrostatycznych $V_i^{TS} - V_i^S$ w miejscach, w których te reszty się znajdują (zgodnie z równaniem 2.18). Można w tym przypadku zastosować albo formalny ładunek reszty (zwykle $-1/0/+1$) albo ładunek punktowy na atomie tworzącym najbliższy kontakt z reagującym układem. Dla pojedynczego fragmentu otoczenia (pojedynczej reszty) obniżenie bariery aktywacji w modelu Coulombowskim jest pojedynczym składnikiem tej sumy, czyli iloczynem ładunku i potencjału różnicowego:

$$\Delta_{Vq}^i = (V_i^{TS} - V_i^S) q_i^E \quad (2.20)$$

Koszt obliczeniowy tego prostego modelu jest znikomy — jego złożoność obliczeniowa zależy liniowo od liczby centrów.

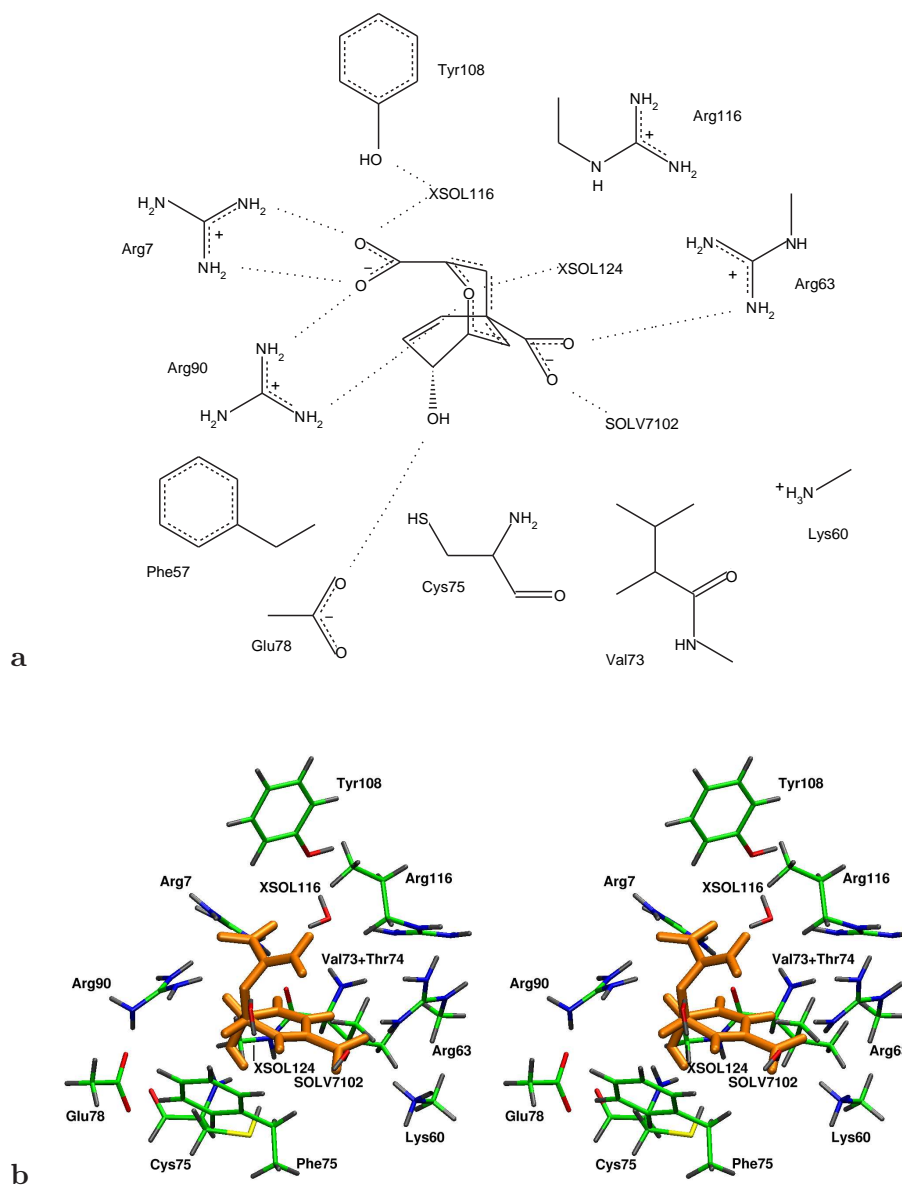
2.4 Model centrum aktywnego

Badania natury oddziaływań w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej oraz obliczenia wkładów poszczególnych reszt do obniżenia bariery aktywacji przeprowadzono w oparciu o modele kompleksów centrum aktywnego z substratem i stanem przejściowym otrzymane w wyniku symulacji⁷⁷ metodą QM/MM opisanych w rozdziale 2.1. Jako substrat wybrano strukturę o współrzędnej reakcji równej -2.0 Å, natomiast dla stanu przejściowego wynosi ona -0.4 Å. Do obliczeń wybrano 10 aminokwasów oraz trzy cząsteczki wody, w przypadku których spodziewano się istotnego wkładu do katalizy. Są to: argininy Arg7, Arg63, Arg90, Arg116, glutaminian Glu78, cysteina Cys75, tyrozyna Tyr108, walina Val73, fenyloalanina Phe57, lizyna Lys60 oraz wody XSOL124, SOLV7102, XSOL116. Wszystkie wartości oddziaływań były liczone w dimerach składających się z substratu lub stanu przejściowego oraz określonej reszty, zatem nie uwzględniano efektów wielociałowych. Aby dodatkowo obniżyć koszt obliczeń, wszystkie reszty zostały ograniczone do fragmentu tworzącego bezpośredni kontakt z substratem lub stanem przejściowym, a przecięte w ten sposób wiązania zostały wysyczone atomami wodoru. W ten sposób argininy Arg7 i Arg90 zastąpiono kationem guanidynowym, argininę Arg63 — kationem metyloguanidynowym, a argininę Arg116 — kationem etyloguanidynowym. Glutaminian zastąpiono anionem octowym, lizynę — kationem metyloaminy, tyrozinę — fenolem, fenyloalaninę — etylobenzenem, a z cysteiny usunięto jedynie grupę -OH tworzącą wiązanie peptydowe. W przypadku waliny Val73, pozostawiono wszystkie atomy, a także wiązanie peptydowe z treoniną Thr74 oraz węgiel C_{α} treoniny, zastąpiony grupą metylową. Otrzymany w ten sposób model przedstawiono na rysunku 2.2.

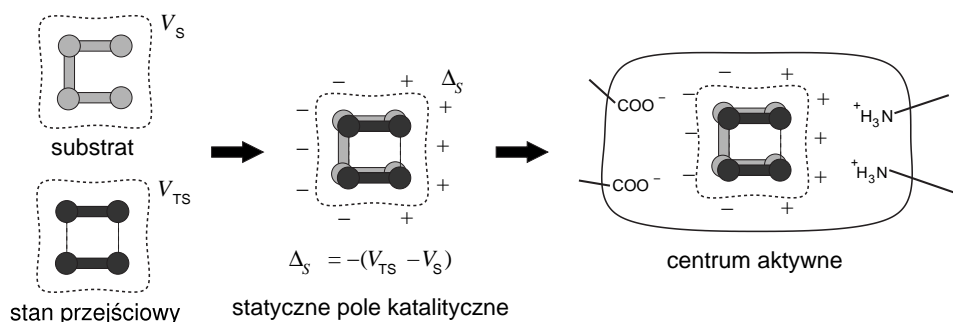
Obliczenia oddziaływań reszt z substratem i stanem przejściowym oraz wkładów do obniżenia bariery aktywacji, prowadzono zgodnie ze schematem przedstawionym w rozdziale 2.3 w bazie funkcyjnej 6-31G(d). W obliczeniach energii monomerów stosowano bazę funkcyjną dimeru, eliminując w ten sposób błąd superpozycji bazy funkcyjnej.

2.5 Pole katalityczne

W przypadku reakcji enzymatycznych, gdzie dominującą składową oddziaływań w centrum aktywnym jest składowa elektrostatyczna ($\Delta E_{el}^{(1)}$), opis można znacznie uprościć, pomijając składowe wyższego rzędu (wymenną, delokalizacyjną i korelacyjną). W wielu wypadkach, model można uprościć jeszcze bardziej, stosując rozwinięcie multipolowe, albo nawet model, w któ-



Rysunek 2.2: (a) Model centrum aktywnego mutazy choryzmianowej stosowany w obliczeniach. (b) Widok stereograficzny centrum aktywnego ze związanym substratem (w kolorze pomarańczowym).



Rysunek 2.3: Idea statycznego pola katalitycznego.

rym wkład ΔV_q i -tej reszty do obniżenia bariery aktywacji jest liczony na podstawie ładunku tej reszty (q_i^E) oraz wartości potencjału elektrostatycznego wytwarzanego przez substrat (V_i^S) i stan przejściowy (V_i^{TS}) w miejscu, w którym ta reszta się znajduje (model oparty na prawie Coulomba):

$$\Delta V_q = (V_i^{TS} - V_i^S)q_i^E \quad (2.21)$$

Z uwagi na addytywny charakter oddziaływań elektrostatycznych najprostszym modelem otoczenia molekularnego może być pojedynczy jednostkowy ładunek próbny. W takiej sytuacji można wyznaczyć tak zwane pola katalityczne (statyczne¹²⁶ oraz dynamiczne^{126,141}), czyli trójwymiarowe mapy ilustrujące przestrzenny rozkład ładunków otoczenia, optymalnych dla danej reakcji (maksymalnie obniżających barierę aktywacji) oraz przewidzieć najkorzystniejsze zmiany tego rozkładu w trakcie trwania reakcji. Pola katalityczne wyznaczane są na podstawie potencjału elektrostatycznego substratu i stanu przejściowego, zatem potrzebna jest tylko znajomość geometrii tych dwóch struktur, natomiast nie jest konieczna żadna wiedza na temat struktury centrum aktywnego. Dzięki temu, pola katalityczne mogą być zastosowane do projektowania katalizatora dla reakcji, która nie jest katalizowana przez żaden enzym; możliwe jest również przewidywanie rozkładu potencjału elektrostatycznego wewnątrz centrum aktywnego o nieznannej strukturze.

Statyczne pole katalityczne definiuje się jako różnicową mapę potencjału elektrostatycznego ze zmienionym znakiem:

$$\Delta_S = -(V^{TS} - V^S) \quad (2.22)$$

gdzie V^{TS} i V^S to rozkład potencjału elektrostatycznego na wspólnej powierzchni otaczającej stan przejściowy i substrat. Sposób, w jaki wyznacza się statyczne pole katalityczne, przedstawiony jest schematycznie na rysunku 2.3.

Geometrie stanu przejściowego i substratu są nakładane na siebie i wyznaczana jest powierzchnia otaczająca obie struktury. Nakładanie struktur

można przeprowadzić na wiele sposobów, na przykład poprzez nałożenie środków ciężkości i zorientowanie momentów bezwładności albo przez czysto geometryczne nałożenie atomów metodą najmniejszych kwadratów (metoda stosowana w niniejszej pracy). Z tego względu, jeśli substrat i stan przejściowy znacząco różnią się geometrią, poprawne nałożenie struktur może być utrudnione. W takim przypadku, zamiast substratu można użyć innej geometrii wybranej ze ścieżki reakcji, po stronie substratów (na przykład wyznaczonej metodą IRC⁷²). Wspomnianą powierzchnią, na której obliczany jest potencjał, może być powierzchnia rozpięta na promieniach van der Waalsa atomów albo powierzchnia o stałej gęstości elektronowej — najlepiej wyznaczonej wspólnie, dla substratu (ρ_{sub}) i stanu przejściowego (ρ_{ts}):

$$\rho_{sub} + \rho_{ts} = const \quad (2.23)$$

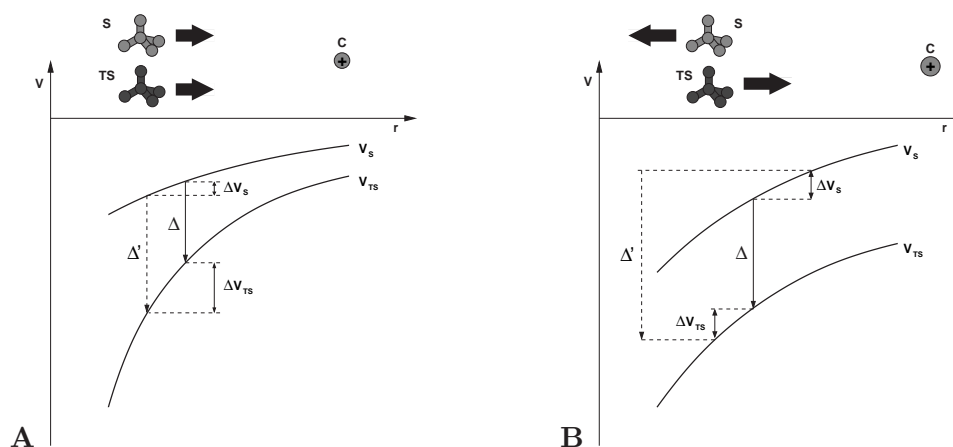
Potencjał elektrostatyczny w wybranym punkcie przestrzeni r obliczany jest jako wartość spodziewana na podstawie funkcji falowej obliczonej na wybranym poziomie teorii (na przykład HF, MP2, CC, ...). W przypadkach, w których dominującym czynnikiem jest składowa elektrostatyczna, a oddziaływania korelacyjne są znikome, wystarczającym poziomem teorii jest metoda Hartree-Focka. Wygodnym sposobem, ze względu na możliwość łatwej manipulacji (odejmowania, dodawania oraz obliczenia gradientu) i wizualizacji, jest wyznaczanie potencjału w postaci plików CUBE w formacie programu Gaussian.¹⁴² W niniejszej pracy, do wizualizacji stosowano program napisany w języku C++, z wykorzystaniem biblioteki VTK.¹⁴³ Program ten, na podstawie dwóch plików CUBE z gęstością elektronową substratu i stanu przejściowego wyznacza powierzchnię o stałej wartości gęstości elektronowej i mapuje na nią wartości różnicowego potencjału obliczonego z dwóch kolejnych plików CUBE z potencjałami elektrostatycznymi substratu i stanu przejściowego (wszystkie cztery pliki CUBE mają ten sam układ współrzędnych). Znak potencjału elektrostatycznego jest zmieniany (zgodnie z równaniem 2.22), aby wartości odpowiadały bezpośrednio znakowi ładunku próbnego obniżającego barierę reakcji. Statyczne pole katalityczne przedstawiane jest jako trójwymiarowa powierzchnia otaczająca substrat i stan przejściowy, na której za pomocą skali kolorów przedstawia się wartość Δ_S .

Ponieważ reakcja chemiczna jest aktem przebiegającym w czasie, efekty wiążące się ze zmianą położenia ładunków otoczenia molekularnego względem reagentów w czasie (efekty dynamiczne) mogą dodatkowo wpływać na obniżenie lub podwyższenie bariery reakcji. Tego rodzaju efekty mogą być przewidywane za pomocą zewnętrznego (Δ_E) i wewnętrznego (Δ_I) pola katalitycznego:

$$\Delta_E = \Delta V_{TS} - \Delta V_S \quad (2.24)$$

$$\Delta_I = \Delta V_{TS} + \Delta V_S \quad (2.25)$$

Rysunek 2.4 ilustruje związek tych pól katalitycznych z ruchem i położeniem reszt lub reagującego układu. Na wstępie do rozważań nad tego rodzaju efek-



Rysunek 2.4: Idea zewnętrznego (A) i wewnętrznego (B) pola katalitycznego.

tami, należy zaznaczyć, że ruch reszty wywołującej określony efekt katalityczny względem reagującego układu, jest równoważny ruchowi tego układu w trakcie reakcji w kierunku przeciwnym. Pierwszym rodzajem efektu dynamicznego jest prosta zmiana położenia reszty lub układu — w przypadku pokazanym na rysunku 2.4A. Zmniejszenie odległości pomiędzy resztą (katalizatorem), a reagującym układem powoduje dodatkowe obniżenie bariery aktywacji; spowodowane jest to większym nachyleniem powierzchni potencjału elektrostatycznego stanu przejściowego niż substratu. Efekt ten może odgrywać rolę w przypadku szybkich reakcji (na przykład przeniesienie protonu) i wolnych ruchów podjednostek białka (znacznie wolniejszych od samej reakcji). Wówczas, z punktu widzenia zachodzącej reakcji, otoczenie jest praktycznie nieruchome, chociaż ze względu na ruch podjednostek białka geometria centrum aktywnego może zmieniać się w czasie, a co za tym idzie, mogą również zmieniać się jego właściwości katalityczne. Drugi typ dynamicznego efektu katalitycznego (efekt wewnętrzny, przedstawiony na rysunku 2.4B) może występować wtedy, gdy ruch jest skorelowany ze współrzędną reakcji, czyli odbywa się w tym samym czasie. O ile w przypadku efektu zewnętrznego można uznać, że odległość reszta — substrat/TS jest stała w trakcie reakcji, o tyle w przypadku efektu wewnętrznego to właśnie zmiana odległości w trakcie reakcji powoduje obniżenie bariery aktywacji.

Wewnętrzne pole katalityczne wyznaczone jest w podobny sposób jak pole statyczne; na powierzchni otaczającej nałożone struktury substratu i stanu przejściowego obliczana jest suma gradientów potencjału elektrostatycznego (różnice potencjału ΔV zastępowane są gradientem ∇V). Procedura ta sprowadza się do wykorzystania tych samych plików CUBE co w przypadku pola Δ_S — pliki z rozkładem gęstości elektronowej służą do wyznaczenia powierzchni, na którą mapowana jest różnica lub suma gradientów

obliczonych z plików CUBE z potencjałami, numerycznie — metodą trój-punktową.^{143,144} Otrzymane w ten sposób wektory ilustrują optymalny ruch dodatniego ładunku próbnego w trakcie reakcji, powodujący obniżenie bariery. Również ten algorytm został zautomatyzowany za pomocą programu do wizualizacji wykorzystującego bibliotekę VTK. Możliwa jest również wizualizacja zewnętrznego pola katalitycznego — w taki sam sposób jak pola Δ_S i Δ_I . W przypadku pola Δ_E wektory są obliczane jako różnica gradientów potencjału elektrostatycznego, a ilustrują one kierunek, w którym znajduje się lepsze od bieżącego (ze względu na obniżenie bariery aktywacji) położenie dodatniego ładunku próbnego. Aby tego rodzaju mapa mogła znaleźć zastosowanie, wektory muszą zostać wyznaczone w miejscach, których już znajdują się fragmenty otoczenia katalitycznego — pokazują one wówczas w jakim kierunku należy szukać lepszego położenia.

Trójwymiarowe pola katalityczne mogą znaleźć swoje zastosowanie przy projektowaniu oraz modyfikacji otoczenia katalitycznego.^{145,120} Jak już wspomniano, zaletą tej metody jest niski koszt obliczeniowy (obliczenia typu *single point*) oraz ograniczenie badanego układu do samego substratu i stanu przejściowego. Warto zaznaczyć, że mapy potencjału elektrostatycznego były już stosowane w modelowaniu właściwości katalitycznych, na przykład w odniesieniu do substratu i stanu przejściowego reduktazy dihydrofolianowej,⁴⁶ jednak nie zbadano efektów różnicowych, ani nie próbowano powiązać ich bezpośrednio z efektami katalitycznymi, pomimo, że w przypadku tego enzymu efekty dynamiczne są obserwowane.^{5,6} Różnicowe mapy potencjału elektrostatycznego badano w przypadku mutazy choryzmianowej,⁶⁹ jednak nie były to mapy wyznaczone dla stanu przejściowego i substratu, a dla stanu przejściowego i inhibitora-analogu stanu przejściowego. Badania te miały na celu określenie przyczyn obniżonej aktywności katalitycznej przeciwciała katalitycznego. Z wyjątkiem prac dotyczących modelowego kompleksu formamid–formamidyna¹⁴⁵ oraz układów adenina–tymina i guanina–cytozyna¹²⁰ oraz pierwszych prac w których zaproponowano ideę pól katalitycznych^{146,45,126,141} nie podejmowano do tej pory żadnych prób analizowania właściwości katalitycznych w oparciu o mapy gradientu potencjału elektrostatycznego.

2.6 Dokowanie inhibitorów w centrum aktywnym

Badania oddziaływań dowolnej cząsteczki z enzymem (substratu, produktu, inhibitora, ...) wymaga znalezienia miejsca jej wiązania. Nie jest to trudne, jeśli znana jest struktura przestrzenna białka, a zwłaszcza jeśli dostępne są struktury z eksperymentu krystalografii rentgenowskiej, które często zawierają związany inhibitor, produkt lub nawet substrat. W przypadku enzymów, dla których brak jest tego typu danych, można posłużyć się metodami modelowania molekularnego.

Jeżeli nie jest znana struktura białka, natomiast dostępna jest sekwencja aminokwasów tego białka, to jego przestrzenny model można otrzymać w wyniku modelowania przez homologię.¹⁴⁷ Metoda ta opiera się na spostrzeżeniu, że struktury o podobnej sekwencji aminokwasów mają podobną strukturę trzeciorzędową, a w zasadzie nawet na stwierdzeniu, które głosi, że natywna struktura trzeciorzędowa białka wynika z sekwencji jego aminokwasów (co zostało zauważone przez Anfinsena¹⁴⁸). Metoda otrzymywania struktury białka przez homologię została zautomatyzowana do tego stopnia, że w Internecie dostępne są obecnie serwisy, które wykonują obliczenia dla zadanej sekwencji i wysyłają plik PDB ze strukturą pocztą elektroniczną*.

Właściwym miejscem wiązania inhibitora, substratu lub produktu wydaje się być centrum aktywne enzymu, jednak w przypadku inhibitorów nie zawsze tak jest. Istnieje duża grupa inhibitorów niekompetycyjnych, które mogą wiązać się do enzymu razem z substratem, a zatem nie zajmują centrum aktywnego. Przykładem są nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy HIV, które wiążą się poza miejscem aktywnym.¹⁴⁹ Z tego względu, w celu znalezienia miejsca wiązania nowego inhibitora, nie wystarczy się ograniczyć do centrum aktywnego, lecz należy zbadać możliwość związania w całej objętości enzymu. W tym celu opracowano metody dokowania, które przy pomocy odpowiedniego algorytmu takiego jak na przykład symulowane wyżarzanie lub algorytm genetyczny, są w stanie spróbkować cały obszar enzymu. W niniejszej pracy stosowano metodę dokowania zaimplementowaną w programie AutoDock¹⁵⁰ do znalezienia miejsca wiązania inhibitora AIP w amoniakoliazie fenyloalaninowej (rozdziały 1.5 i 3.5).

Ponieważ struktura tego enzymu została udostępniona dopiero niedawno,¹⁰⁵ w dokowaniu posłużono się strukturą opartą na homologii z pokrewnym enzymem — amoniakoliazą histydyny, HAL. Model PAL, dostarczony do badań przez prof. Jánosa Réteya,¹⁰⁴ został stworzony w programie SwissPDBViewer na podstawie struktury HAL zdeponowanej w bazie PDB (numer rekordu 1B8F). Fragment złożony z aminokwasów od 64 do 531 został zbudowany w oparciu o homologię i zoptymalizowany w polu siłowym MM+ w programie Hyperchem, po czym aminokwasy Ala202-Ser203-Gly204 zostały zastąpione grupą prostetyczną MIO. Cały fragment został powielony (enzym PAL jest homotetramerem) i dobudowano do niego fragmenty zawierające aminokwasy 1–63 oraz 532–716 (szczegóły modelowania opisuje oryginalna praca Dagmar Röther i współpracowników¹⁰⁴).

Do struktury enzymu dobudowano atomy wodoru i przypisano ładunki punktowe z pola siłowego Charmm27 w pakiecie InsightII. Dodano również parametry solwatacyjne programem Addsol z pakietu AutoDock. W celu przyspieszenia obliczeń, program AutoDock wykorzystuje trójwymiarowe siatki punktów, w których wyznaczono (za pomocą empirycznego wzoru) energie oddziaływań atomów różnych typów z enzymem oraz potencjał

*Na przykład serwis <http://swissmodel.expasy.org/>¹⁴⁷

elektrostatyczny. Taka siatka jest generowana dla każdego typu atomu, jaki znajduje się w inhibitorze. Siatki zawierały $60 \times 60 \times 60$ węzłów co 0.375 \AA i były wyśrodkowane na centrum aktywnym enzymu. Struktury inhibitorów zostały zoptymalizowane na poziomie HF/6-311G(d), a w procedurze dokowania używano ładunków punktowych obliczonych metodą Chelpg.¹⁵¹ Dokowanie każdej formy inhibitora powtarzano 50 razy, aby uzyskać zbiór wyników do statystycznej analizy, która polega w tym przypadku na ocenie ilości i wielkości klasterów. Za każdym razem zaczynano od nowej, losowo wybranej populacji konformerów („osobników”). Wynikiem każdej próby był pojedynczy konformer z ostatniego pokolenia, o najniższej entalpii wiązania. Klaster jest zdefiniowany jako zbiór zadokowanych egzemplarzy inhibitora, dla których średnie odchylenie kwadratowe (RMSD) odległości pomiędzy odpowiadającymi sobie atomami nie przekracza 1 \AA . Dokowanie przeprowadzono za pomocą algorytmu genetycznego¹⁵⁰ (LGA), stosując za każdym razem następujące parametry:

liczba osobników w populacji	50
maksymalna ilość obliczeń energii	1 000 000
liczba pokoleń	27 000
liczba „najlepszych” osobników przeżywających	1
prawdopodobieństwo mutacji	0.02
prawdopodobieństwo krzyżowania	0.80

W trakcie dokowania struktura enzymu była sztywna, natomiast wartości kątów dwuściennych w cząsteczce inhibitora podlegały optymalizacji.

2.7 Międzycząsteczkowe przeniesienie ładunku

Wartość przeniesienia ładunku można wyznaczyć obliczając sumę ładunków punktowych uzyskanych z funkcji falowej na atomach monomeru w dime-rze i porównując ją z formalnym ładunkiem danego monomeru. Niestety, wielkości wyznaczanych ładunków punktowych bywają tak zróżnicowane, że otrzymane wartości CT są niepoprawne nawet jakościowo, skutkując w niektórych wypadkach przeniesieniem ładunku w kierunku przeciwnym do poprawnego.¹¹⁶ Przyczyną tego może być arbitralność stosowanych analiz populacyjnych, silna zależność CT od wielkości stosowanej bazy funkcyjnej oraz błąd superpozycji bazy funkcyjnej.¹¹⁶

W niniejszej pracy przetestowano szereg metod wyznaczania ładunków punktowych, zbadano ich zależność od wielkości bazy funkcyjnej oraz wpływ stosowanego poziomu teorii (zbadano metody HF, MP2, DFT i sprzężonych klasterów). Wyniki porównywano z nielicznymi znanymi wartościami CT wyznaczonymi eksperymentalnie. Do testów wybrano szereg dimerów typu kwas–zasada Lewisa, dla których znane są od niedawna eksperymentalne wielkości CT: $\text{HCN}\cdot\text{SO}_3$, $\text{CH}_3\text{CN}\cdot\text{SO}_3$, $\text{H}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, $\text{H}_3\text{N}\cdot\text{BF}_3$ i $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{BF}_3$. Ponieważ są to małe układy, można dla nich wykonać obli-

czenia zaawansowanymi metodami, takimi jak metoda sprzężonych klastków (CC), w dużej bazie funkcyjnej. Aby sprawdzić wpływ wielkości bazy funkcyjnej obliczenia wykonano w bazach funkcyjnych typu *correlation consistent* Dunninga^{152,153,154} cc-pVXZ, gdzie X = D, T, Q, których rozmiar rośnie w sposób systematyczny. Geometria wszystkich kompleksów została wyznaczona metodą MP2, w bazie 6-31+G(2d,p).

Spośród dostępnych metod wyznaczania ładunków punktowych, w niniejszej pracy zastosowano: metodę analizy populacyjnej Mullikena,¹¹⁵ metodę AIM Badera,¹⁵⁵ metodę Natural Population Analysis¹⁵⁶ (NPA) oraz metody oparte na aproksymacji ładunków punktowych do wartości spodziewanych potencjału elektrostatycznego wytwarzanego przez cząsteczkę.^{157,151} Istnieje również wiele innych metod, zarówno opartych na podziale w przestrzeni Hilberta¹⁵⁸ (analizy populacyjne) jak i na podziale w przestrzeni rzeczywistej (na przykład metoda ELF¹⁵⁹).

Teoretyczne modele ładunków punktowych dzieli się na cztery klasy:²² do pierwszej z nich zalicza się metody opierające się na przesłankach nie wynikających z metod chemii kwantowej — są to na przykład metody przybliżające ładunki punktowe tak, aby odtwarzały obserwowane wielkości eksperymentalne. Do klasy drugiej ładunków punktowych zaliczają się wielkości uzyskane z analiz populacyjnych. Najbardziej rozpowszechnioną, jest metoda analizy populacyjnej Mullikena.¹¹⁵ Jest to jedna z wielu metod bazujących na sumowaniu wkładów od poszczególnych orbitali atomowych, w których ładunek q_A na atomie A można ogólnie zapisać jako:

$$q_A = Z_A - \sum_{i \in A} \sum_j \sum_k (S^x)_{ij} P_{jk} (S^{1-x})_{ik} \quad (2.26)$$

gdzie Z_A jest ładunkiem jądra danego atomu, i, j, k są indeksami orbitali atomowych (jedna z sum przebiega po orbitalach atomu A), P jest macierzą rzędów wiązań, S jest macierzą całek nakładania, a x jest pewną arbitralną liczbą z zakresu 0 – 1. W przypadku analizy populacyjnej Mullikena $x = 0$ lub $x = 1$, natomiast jeśli $x = 0.5$ to jest to analiza populacyjna Löwdina. Do drugiej klasy ładunków punktowych zaliczają się również ładunki uzyskane metodą NPA.

O ile w przypadku metod populacyjnych podział gęstości elektronowej na ładunki odbywa się w przestrzeni Hilberta, o tyle w metodzie AIM¹⁵⁵ podział ten odbywa się w przestrzeni rzeczywistej współrzędnych kartezjańskich układu, na podstawie powierzchni podziału między atomami. Powierzchnie mają taki przebieg, że gradient gęstości elektronowej wzdłuż normalnej do tej powierzchni w danym punkcie przestrzeni wynosi zero. Metoda AIM zalicza się do trzeciej klasy ładunków punktowych, które oblicza się na podstawie fizycznych wielkości otrzymywanych z funkcji falowej — w tym przypadku jest to gęstość elektronowa.

Również do klasy trzeciej zaliczają się tak zwane metody ESP, czyli metody polegające na obliczaniu ładunków punktowych przybliżających wartości

potencjału elektrostatycznego. Ponieważ jest on wartością spodziewaną, może być obliczony z dobrą dokładnością na podstawie funkcji falowej w zbiorze m punktów w przestrzeni otaczającej cząsteczkę. Następnie, metodą najmniejszych kwadratów można dobrać zestaw n ładunków $q_1, q_2, q_3, \dots, q_n$, zwykle rozmieszczonych na atomach (możliwe jest dowolne rozmieszczenie, na przykład na atomach i środkach wiązań), które minimalizują funkcję f :

$$f(q_1, q_2, q_3, \dots, q_n) = \sum_{i=1}^m [V_i - E_i(q_1, q_2, q_3, \dots, q_n)]^2 \quad (2.27)$$

gdzie V_i oznacza potencjał elektrostatyczny wytwarzany w i -tym punkcie, przez gęstość elektronową ρ i ładunki jąder Z_a . Obliczany jest on według wzoru:

$$V_i(\mathbf{r}) = \sum_a \frac{Z_a}{|r_a - r|} - \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}' - \mathbf{r}|} d\mathbf{r}' \quad (2.28)$$

który w przybliżeniu Hartree-Focka lub Kohna-Shama sprowadza się do wyrażenia:

$$V_i(\mathbf{r}) = \sum_a \frac{Z_a}{|r_a - r|} - \sum_j \sum_k^{AO} P_{jk} \int \frac{\chi_j^* \chi_k}{|\mathbf{r}' - \mathbf{r}|} d\mathbf{r}' \quad (2.29)$$

gdzie indeksy j, k przebiegają po wszystkich orbitalach atomowych χ , a P_{jk} to odpowiednie elementy macierzy rzędów wiązań. E_i jest wartością potencjału elektrostatycznego w i -tym punkcie, obliczonym na podstawie zbioru fitowanych ładunków:

$$E_i = \sum_{j=1}^n \frac{q_j}{r_{ij}} \quad (2.30)$$

Na tej procedurze bazują metody Chelp¹⁵⁷ i Chelpg¹⁵¹ różniące się jedynie algorytmem generowania punktów przeznaczonych do fitowania ładunków oraz ilością tych punktów. Ostatnia (czwarta) klasa ładunków punktowych, wykorzystuje ładunki z klasy II lub III i modyfikuje je tak, aby dobrze opisywały wielkości obserwowane eksperymentalnie, co ma za zadanie wyeliminować błędy metody, którą użyto do wyznaczenia funkcji falowej.²²

Wielkość międzycząsteczkowego przeniesienia ładunku może być także obliczona na podstawie stałych sprzężeń kwadrupolowych metodą Townesa i Dailey'a,¹⁶⁰ które mierzone są w eksperymentach spektroskopii mikrofalowej.^{161, 162, 163, 164} W niniejszej pracy wykorzystano wartości CT uzyskane tą metodą do oceny wyników obliczeń CT metodami *ab initio* w różnych bazach funkcyjnych i różnymi metodami wyznaczania ładunków punktowych. Zostały one zaczerpnięte z następujących prac (w nawiasie podano odsyłacz do pozycji w bibliografii): HCN·SO₃ (162), CH₃CN·SO₃ (162), H₃N·SO₃ (161), (CH₃)₃N·SO₃ (163), H₃N·BF₃ (165), (CH₃)₃N·BF₃ (165).

Rozdział 3

Wyniki badań

3.1 Oddziaływania w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej

Dla wybranych dziesięciu reszt z centrum aktywnego mutazy choryzmianowej i trzech cząsteczek wody, przeprowadzono analizę oddziaływań z substratem i stanem przejściowym²⁷ (metodę opisano w rozdziale 2.3, a model centrum aktywnego przedstawiono w rozdziale 2.4). W tabelach 3.1 i 3.2 zamieszczono wartości składowych energii oddziaływania dla poszczególnych reszt z otoczenia katalitycznego, uszeregowanych według malejącego wkładu do obniżenia bariery aktywacji (tabela 3.3). Ze względu na ujemny ładunek substratu i stanu przejściowego, największy udział w stabilizacji obu struktur mają dodatnio naładowane reszty — argininy i lizyna, natomiast glutaminian ma największy wkład do destabilizacji.

W tabeli 3.3 przedstawiono udział poszczególnych reszt w obniżeniu bariery aktywacji Δ (różnicowej stabilizacji stanu przejściowego). Zdecydowanie największy wkład do obniżenia bariery aktywacji mają naładowane aminokwasy — argininy oraz glutaminian, a także cząsteczka wody XSOL124, która jest obserwowana w strukturze krystalograficznej mutazy choryzmianowej ze związanym inhibitorem. Pozostałe reszty, pomimo bliskiego kontaktu z reagującym układem, nie mają wpływu na obniżenie bariery aktywacji. Jak pokazuje przypadek lizyny Lys60 oraz glutaminianu Glu78, nawet przy znacznej stabilizacji (lizyna) reszta może nie mieć wpływu na obniżenie bariery lub wręcz ją podnosić, a z drugiej strony aminokwas, która destabilizuje substrat i stan przejściowy (glutaminian) może być jedną z reszt, które najsilniej przyczyniają się do obniżenia bariery aktywacji, poprzez silniejszą destabilizację substratu. Największy wkład do różnicowej stabilizacji stanu przejściowego wnosi arginina Arg90 (-9.06 kcal/mol), co potwierdza wyniki wcześniejszych obliczeń QM/MM.^{31,75,77} Rola argininy Arg90 znajduje swoje potwierdzenie także w wynikach eksperymentów ukierunkowanej mutagenезy, które wykazują $2.6 \cdot 10^4$ -krotne obniżenie wydajności enzymu

Tabela 3.1: Składowe energii oddziaływania w kompleksie z choryzmianem (wszystkie wartości są wyrażone w kcal/mol). Składowe: $\Delta E_{el,pen}^{(1)}$ – penetracyjna, $\Delta E_{ex}^{(1)}$ – wymienna, pierwszego rzędu, $\Delta E_{del}^{(R)}$ – delokalizacyjna, wyższych rzędów, ΔE_{corr} – korelacyjna. Poziomy teorii: $\Delta E_{el,mtp}^{(1)}$ – multipolowy, ΔE_{HL} – Heitlera-Londona, ΔE^{SCF} – energia oddziaływania na poziomie metody Hartree-Focka, ΔE^{MP2} – energia oddziaływania na poziomie metody Mølera-Plesseta drugiego rzędu. Reszty zostały uszeregowane według malejącego wkładu do obniżenia bariery aktywacji. Energje oddziaływania w kompleksie z Glu78 i Cys75 zostały wyznaczone dla optymalnej konformacji (szczegóły w tekście).

Reszta	$\Delta E_{el,mtp}^{(1)}$	$\Delta E_{el,pen}^{(1)}$	$\Delta E_{el}^{(1)}$	$\Delta E_{ex}^{(1)}$	ΔE_{HL}	$\Delta E_{del}^{(R)}$	ΔE^{SCF}	ΔE_{corr}	ΔE^{MP2}
Arg90	-155.09	-5.31	-160.40	35.36	-125.04	-26.41	-151.45	-7.92	-159.37
Arg7	-161.41	-10.63	-172.04	47.42	-124.62	-31.12	-155.74	-5.37	-161.11
Glu78	81.94	-3.48	78.46	10.11	88.58	-7.84	80.74	-0.51	80.23
XSOL124	-12.00	-5.23	-17.22	16.21	-1.02	-5.31	-6.33	-2.27	-8.60
Arg116	-96.75	-0.27	-97.02	1.10	-95.92	-4.29	-100.21	-1.65	-101.86
Arg63	-137.41	-6.13	-143.54	27.52	-116.03	-20.75	-136.78	-3.56	-140.33
Cys75	-0.41	-3.81	-4.22	9.26	5.04	-3.72	1.32	-2.28	-0.96
SOLV7102	-19.24	-5.73	-24.97	23.87	-1.10	-11.16	-12.26	-0.09	-12.35
XSOL116	-20.27	-6.37	-26.64	24.17	-2.47	-10.37	-12.84	-0.08	-12.92
Tyr108	3.46	-0.83	2.63	1.87	4.50	-4.52	-0.02	-1.25	-1.27
Val73	6.39	-1.68	4.72	5.03	9.75	-2.85	6.90	-3.43	3.46
Phe57	1.38	-2.00	-0.62	4.85	4.23	-3.61	0.63	-3.51	-2.88
Lys60	-71.56	0.00	-71.56	0.00	-71.56	-0.69	-72.25	0.22	-72.03

Tabela 3.2: Składowe energii oddziaływania w kompleksie ze stanem przejściowym (wszystkie wartości są wyrażone w kcal/mol). Opis składowych w nagłówku tabeli 3.1. Δ jest różnicą energii oddziaływania w kompleksie ze stanem przejściowym i energii oddziaływania w kompleksie z substratem (tabela 3.1).

Reszta	$\Delta E_{el.mtp}^{(1)}$	$\Delta E_{el.pen}^{(1)}$	$\Delta E_{el}^{(1)}$	$\Delta E_{ex}^{(1)}$	ΔE_{HL}	$\Delta E_{del}^{(R)}$	ΔE_{SCF}	ΔE_{corr}	ΔE_{MP2}
Arg90	-160.32	-11.08	-171.40	39.18	-132.22	-30.90	-163.12	-5.31	-168.43
Arg7	-168.16	-12.23	-180.39	52.96	-127.43	-34.97	-162.40	-4.60	-167.01
Glu78	77.27	-0.14	77.13	0.28	77.41	-2.79	74.62	2.04	76.66
XSOL124	-17.84	-5.92	-23.76	22.10	-1.67	-8.68	-10.35	-0.73	-11.08
Arg116	-99.33	-0.16	-99.49	0.81	-98.68	-5.23	-103.91	-0.40	-104.31
Arg63	-137.50	-6.41	-143.91	26.56	-117.35	-20.22	-137.57	-4.16	-141.73
Cys75	-1.44	-4.79	-6.23	11.84	5.61	-4.23	1.38	-3.15	-1.77
SOLV7102	-18.60	-5.34	-23.94	22.90	-1.04	-10.71	-11.74	-1.02	-12.77
XSOL116	-20.38	-5.96	-26.34	22.91	-3.43	-10.38	-13.81	0.51	-13.30
Tyr108	3.46	-0.33	3.13	0.74	3.88	-3.86	0.02	-1.00	-0.98
Val73	7.11	-1.44	5.66	5.00	10.66	-2.81	7.85	-3.71	4.14
Phe57	2.01	-2.37	-0.36	5.28	4.91	-2.84	2.07	-4.10	-2.03
Lys60	-70.26	0.00	-70.26	0.00	-70.26	-0.67	-70.93	0.29	-70.64
Δ	-23.01	-4.70	-27.74	3.79	-23.95	-5.65	-29.60	6.36	-23.26

Tabela 3.3: Różnicowa stabilizacja stanu przejściowego Δ w mutacji choryzmianowej (wszystkie wartości wyrażone w kcal/mol). Poziomy teorii: Δ_V – energia elektrostatyczna, obliczona w oparciu o potencjał elektrostatyczny i ładunek formalny reszty, Δ_{V-HF} – energia elektrostatyczna, obliczona w oparciu o potencjał elektrostatyczny i ładunek na atomie tworzącym najbliższy kontakt (wyznaczony metodą Chelpg), w przypadku Arg7 i Arg90 przedstawiono dwa krótkie kontakty (mają zblizoną odległość), $\Delta_{el}^{(1)}$ – energia elektrostatyczna, obliczona z rozwinięcia multipolowego DMA, $\Delta_{el}^{(1)}$ – energia elektrostatyczna pierwszego rzędu w rachunku zaburzeń, Δ_{HL} – energia Heitlera-Londona, Δ_{SCF} – energia na poziomie metody Hartree-Focka, Δ_{MP2} – energia na poziomie metody Møllera-Plesseta drugiego rzędu. Reszty zostały uszeregowane według malejącego wkładu do obniżenia bariery aktywacji. Wkłady dla Glu78 i Cys75 zostały wyznaczone dla optymalnej konformacji (szczegóły w tekście). CC oznacza współczynnik korelacji obliczony względem wyników na poziomie MP2.

Reszta	Δ_V	Δ_{V-HF}	$\Delta_{el}^{(1)}$	$\Delta_{el}^{(1)}$	$\Delta_{el}^{(1)}$	Δ_{HL}	Δ_{SCF}	Δ_{MP2}	QM/MM ^a
Arg90	-7.55	-3.89	-5.23	-11.00	-7.18	-11.67	-9.06	-4.30	
Arg7	-8.18	-4.11	-6.75	-8.35	-2.81	-6.66	-5.90	-2.72	
Glu78	-3.15	-2.80	-4.67	-1.33	-11.17	-6.12	-3.57	-1.64	
XSOL124	0.0	-9.28	-5.84	-6.54	-0.65	-4.02	-2.48	-2.01	
Arg116	-7.32	-0.48	-2.58	-2.47	-2.76	-3.70	-2.45	—	
Arg63	0.76	0.32	-0.09	-0.37	-1.32	-0.79	-1.40	-2.07	
Cys75	0.0	-2.69	-1.03	-2.01	0.57	0.06	-0.81	-0.08	
SOLV7102	0.0	1.02	0.64	1.03	0.06	0.52	-0.42	0.10	
XSOL116	0.0	-1.21	-0.11	0.30	-0.96	-0.97	-0.38	-0.59	
Tyr108	0.0	0.59	0.0	0.50	-0.62	0.04	0.29	—	
Val73	0.0	0.53	0.72	0.94	0.91	0.95	0.68	—	
Phe57	0.0	-0.25	0.63	0.26	0.68	1.44	0.85	—	
Lys60	1.08	0.38	1.30	1.30	1.30	1.32	1.39	—	
Sum	-24.36	-21.87	-23.01	-27.74	-23.95	-29.60	-23.26	—	
CC	0.83	0.55	0.85	0.92	0.71	0.98	1.00	0.91	

^aDane z obliczeń QM/MM na poziomie AM1/CHARMM22 (model A w pracy 75)

^bSuma z uwzględnieniem obu kontaktów Arg90 i Arg7

(k_{cat}/K_m) w wyniku zastąpienia argininy lizyną oraz całkowity zanik aktywności w przypadku zastąpienia argininy alaniną.^{85,95} Podobnie, zastąpienie argininy Arg7 alaniną obniża wydajność 10⁶-krotnie, natomiast zastąpienie lizyną — 10³-krotnie.⁵³ Wyniki te pokazują również, że w katalizie istotny jest ładunek reszty, bo wymiana dodatnio naładowanej argininy na dodatnio naładowaną lizynę nie pozbawia enzymu aktywności. Wniosek ten nie ogranicza się tylko do mutazy choryzmianowej z *B. subtilis*, ale dotyczy również enzymów wyizolowanych z innych organizmów, bo podobne zachowanie zaobserwowano w przypadku argininy Arg11 w mutacie choryzmianowej z *E. coli*, która jest odpowiednikiem Arg7 w mutacie choryzmianowej z *B. subtilis*.⁵² Badania metodą ukierunkowanej mutagenezy potwierdzają również niewielki udział cysteiny Cys75.⁵⁰ Częściową zgodność wkładów do różnicowej stabilizacji stanu przejściowego obserwuje się również w porównaniu z wynikami wcześniejszych obliczeń QM/MM na poziomie półempirycznym AM1+CHARMM22 (tabela 3.3) jednak wyniki obliczeń półempirycznych są systematycznie zaniżone.⁷⁵

Na całkowite obniżenie bariery aktywacji względem fazy gazowej, obliczone na poziomie metody MP2/6-31G(d), na podstawie wkładów od kompleksów z poszczególnymi resztami, składają się następujące udziały reszt (w nawiasach podano wkład do obniżenia bariery aktywacji w kcal/mol): Arg90 (−9.06), Arg7 (−5.90), Glu78 (−3.57), XSOL124 (−2.48), Arg116 (−2.45), Arg63 (−1.40), Cys75 (−0.81), SOLV7102 (−0.42), XSOL116 (−0.38), Tyr108 (0.29), Val73 (0.68), Phe57 (0.85) and Lys60 (1.39). Wyniki te zgadzają się z wcześniejszymi obliczeniami metodą QM/MM na niższych poziomach teorii.^{31,74,76,75,77} W oparciu o wyniki obliczeń QM/MM,⁷⁷ które dostarczyły modelu do tych obliczeń obniżenie bariery aktywacji oszacowano na −19.7 kcal/mol.

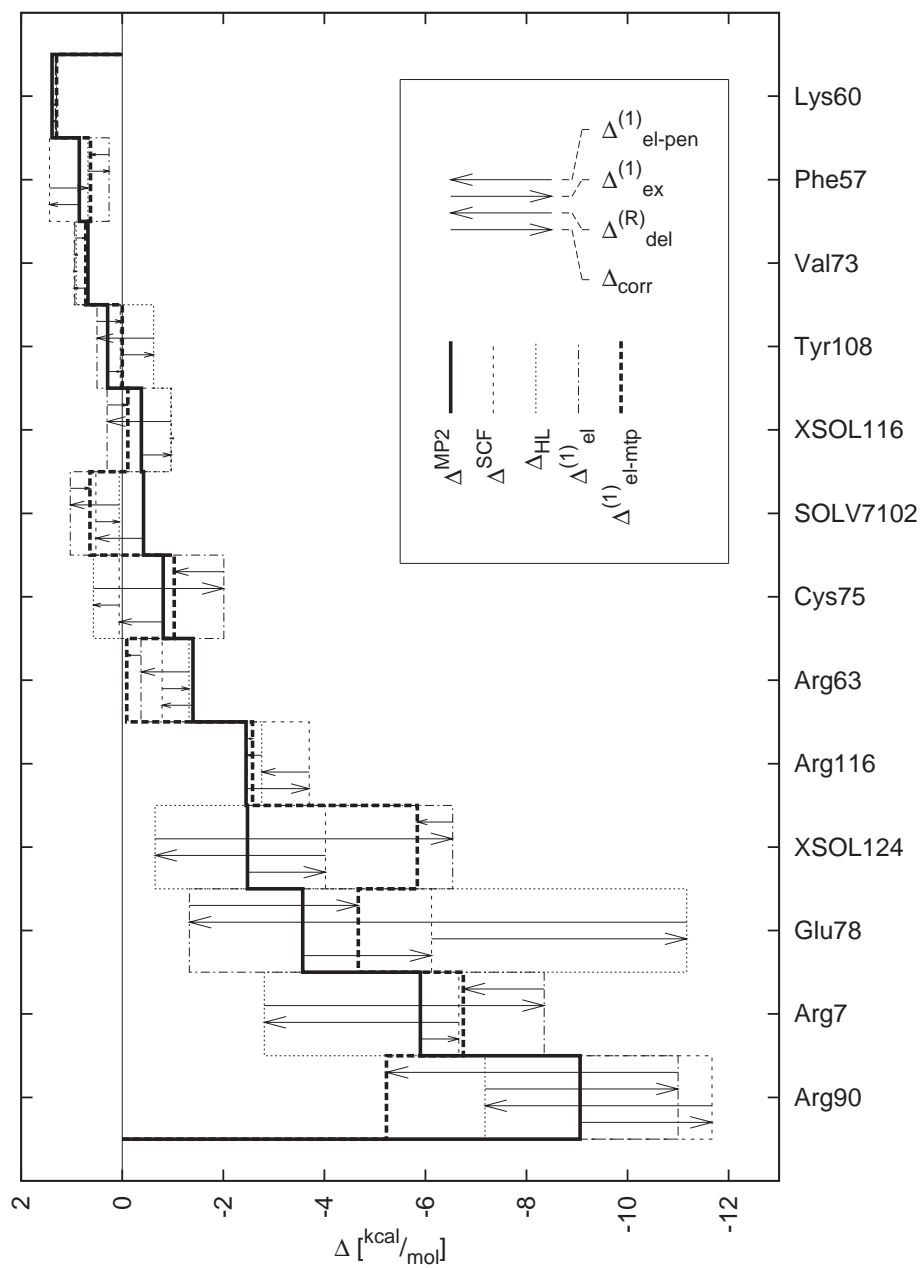
Całkowite obniżenie bariery aktywacji na poziomie metody HF/6-31G(d) jest znacznie przeszacowane (−29.6 kcal/mol) w stosunku do wartości na poziomie metody MP2, jednak współczynnik korelacji pomiędzy tymi poziomami jest bardzo wysoki (0.98). Oznacza to, że składowa korelacyjna (Δ_{corr}) ma duży wkład do obniżenia bariery aktywacji, jednak jest on zbliżony dla wszystkich reszt i jest nieistotny przy względnej ocenie wpływu poszczególnych aminokwasów. Bardzo dobrym oszacowaniem całkowitej energii różnicowej stabilizacji stanu przejściowego, okazał się być poziom rozwinięcia multipolowego, na którym otrzymano wartość Δ wynoszącą −23.0 kcal/mol. Wynika to z wzajemnego kasowania się wkładów: penetracyjnego ($\Delta_{el.pen}^{(1)}$), wymiennego ($\Delta_{ex}^{(1)}$), delokalizacyjnego ($\Delta_{del}^{(R)}$) i korelacyjnego (Δ_{corr}). Jest to zatem fizyczne potwierdzenie, oparte na pierwszych zasadach, wcześniejszych obserwacji, z których wynikało, że stabilizacja stanu przejściowego w mutacie choryzmianowej wynika wyłącznie z oddziaływań elektrostatycznych w centrum aktywnym.^{51,28,76,75,77} Štrajbl i współpracownicy,²⁸ stosując metodę *Empirical Valence Bond* (EVB), stwierdzili, że oddziaływania

elektrostatyczne stabilizują stan przejściowy ułatwiając w ten sposób zbliżenie dwóch ujemnie naładowanych grup karboksylowych choryzmianu, co jest konieczne dla zajścia reakcji. Wkłady reszt do obniżenia bariery aktywacji na poszczególnych poziomach teorii (tabela 3.3) ilustruje rysunek 3.1, który nawiązuje do idei „elektrostatycznego zamka”.¹⁶⁶

We wstępnych obliczeniach obniżenia bariery aktywacji, glutaminian Glu78 wnosił dodatni wkład do wartości Δ (+2.6 kcal/mol), czyli wykazywał charakter inhibicyjny, w odróżnieniu od wyników Lee.⁷⁴ Celem wyjaśnienia tej rozbieżności wykonano szczegółową analizę konformacyjną, opisaną w rozdziale 3.4 i uzyskano bardziej optymalny (ze względu na obniżenie bariery aktywacji) model centrum aktywnego, w którym proton H4 grupy hydroksylowej w choryzmianie i w stanie przejściowym jest skierowany w stronę glutaminianu, a odległość pomiędzy tlenem tejże grupy hydroksylowej i tlenem w grupie karboksylowej glutaminianu wynosi 2.85 Å w kompleksie z substratem i 3.88 Å w kompleksie ze stanem przejściowym.

Bariera aktywacji obliczona na poziomie metody RHF/6-31G(d) / CHARMM22 QM/MM wynosi 11.0 kcal/mol z uwzględnieniem poprawki na poziomie metody MP2/6-31+G(d) (przez dodanie różnicy energii wyznaczonej w fazie gazowej) oraz 16.1 kcal/mol z uwzględnieniem poprawki na poziomie metody B3LYP/6-311+G(2d,p).⁷⁷ Eksperymentalna wartość ΔH^\ddagger wynosi 12.7 kcal/mol.⁵⁰ Porównanie obliczonej bariery z odpowiednią wielkością dla roztworu (obliczoną w modelu *Polarizable Continuum Model*, PCM) pozwala oszacować przyspieszenie reakcji względem reakcji niekatalizowanej na $1.3 \cdot 10^{13}$ (z poprawką MP2/6-31+G(d)) do $7.5 \cdot 10^6$ (z poprawką B3LYP/6-311+G(2d,p)) co — biorąc pod uwagę wykładniczą zależność — dość dobrze zgadza się z wartością eksperymentalną, która wynosi $4.5 \cdot 10^6$.

Bariera aktywacji dla reakcji przegrupowania choryzmianu do preferianu w fazie gazowej, obliczona metodą RHF/6-31G(d) dla geometrii zoptymalizowanych w fazie gazowej,⁷⁵ wynosi 48.4 kcal/mol, natomiast dla geometrii używanych w niniejszej pracy, czyli związanych w centrum aktywnym, wynosi 49.0 kcal/mol (jest to różnica energii obszaru QM z obliczeń QM/MM⁷⁷). Prawdopodobnie są to wartości zawyżone, bo zastosowanie metody uwzględniającej efekty korelacyjne, na przykład B3LYP/6-31G(d) daje znacznie niższą barierę: 24.8 kcal/mol. Bariera aktywacji w enzymie obliczona na podstawie wysokości bariery w fazie gazowej (49.0 kcal/mol) i obniżenia bariery aktywacji wyznaczonego na poziomie RHF/6-31G(d) ($\Delta^{SCF} = -29.6$ kcal/mol) jest również zawyżona w porównaniu z wartością eksperymentalną⁵⁰ — wynosi 19.4 kcal/mol. Z drugiej strony na podstawie wysokości bariery w fazie gazowej skorygowanej obliczeniami DFT oraz obniżenia bariery aktywacji na poziomie metody MP2 ($\Delta^{MP2} = -23.3$ kcal/mol) otrzymuje się barierę aktywacji o wysokości 1.5 kcal/mol. Jednak na tak dużą rozbieżność względem wielkości eksperymentalnych może mieć wpływ wiele czynników. Przede wszystkim, Δ zawiera wyłącznie wkłady od 13 reszt i jej wartość może ulec zmianie, gdyby wziąć pod uwagę cały enzym. Ponad-



Rysunek 3.1: Różnicowa stabilizacja stanu przejściowego w mutacji choryzmianowej — wkłady poszczególnych reszt do obniżenia bariery aktywacji. Strzałki ilustrują wzajemne kasowanie się błędów wynikających z pominięcia składowych: korelacyjnej, delokalizacyjnej, wymiennej i penetracyjnej. Symbole opisano w nagłówku tabeli 3.3 oraz w tekście.

to, nie uwzględnia się tutaj wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań w enzymie. Wkład części MM do bariery aktywacji został oszacowany w obliczeniach QM/MM⁷⁷ na 6 kcal/mol. Uwzględnienie tej składowej daje barierę aktywacji o wysokości 7.5 kcal/mol. Hall i współpracownicy⁸⁸ wyznaczyli wielkość obniżenia bariery aktywacji, optymalizując strukturę mutazy choryzmianowej metodą QM/MM (obliczenia w części QM były wykonane na poziomie metody B3LYP/6-31G(d)). Otrzymali oni wartość Δ wynoszącą -27.7 kcal/mol, co daje barierę rzędu 1.4 kcal/mol, jednak w tym przypadku prawdopodobnie nie uwzględniono wkładu części MM. Po dodaniu wspomnianej wyżej wartości 6 kcal/mol, otrzymuje się barierę o wysokości 7.4 kcal/mol. Na podstawie obliczeń Crespo i współpracowników⁷⁶ (metodą QM/MM, z zastosowaniem funkcjonału PBE i bazy funkcyjnej DZVP dla części QM) otrzymuje się obniżenie bariery aktywacji względem fazy gazowej wynoszące -27 do -28 kcal/mol, natomiast z obliczeń QM/MM⁷⁴ (w części QM stosowano metodę RHF/4-31G, a w części MM stosowano pole siłowe CHARMM) wynika wartość Δ rzędu -20 kcal/mol.

Jak pokazują powyższe rozważania, całkowita wartość różnicowej stabilizacji stanu przejściowego wynosząca około -23 kcal/mol po uwzględnieniu wkładu wynikającego ze zmiany energii samego enzymu daje dość dobre oszacowanie wysokości bariery. Otrzymana wartość Δ potwierdza, że różnicowa stabilizacja stanu przejściowego jest podstawowym mechanizmem działania mutazy choryzmianowej. Względna stabilizacja stanu przejściowego jest znaczna, pomimo, że związany substrat ma strukturę odpowiadającą definicji NAC,³⁶ a tym samym wyklucza większość efektów, które mogłyby być związane z proponowaną teorią NAC. Efekty te zostały oszacowane niezależnie dwoma metodami obliczeniowymi: metodą *Free Energy Perturbation* (FEP) obliczono,⁴⁰ że wynoszą one 3.8–4.6 kcal/mol, natomiast metodą *Empirical Valence Bond* (EVB) oszacowano tą wielkość na około 5 kcal/mol.²⁸ Możliwe, że proponowany wkład NAC do katalizy nie polega na obniżeniu bariery aktywacji, lecz na ograniczeniu przestrzeni konformacyjnej substratu i zmniejszeniu szerokości bariery, co również może zwiększać prawdopodobieństwo zajścia reakcji.

3.2 Statyczne pole katalityczne mutazy choryzmianowej

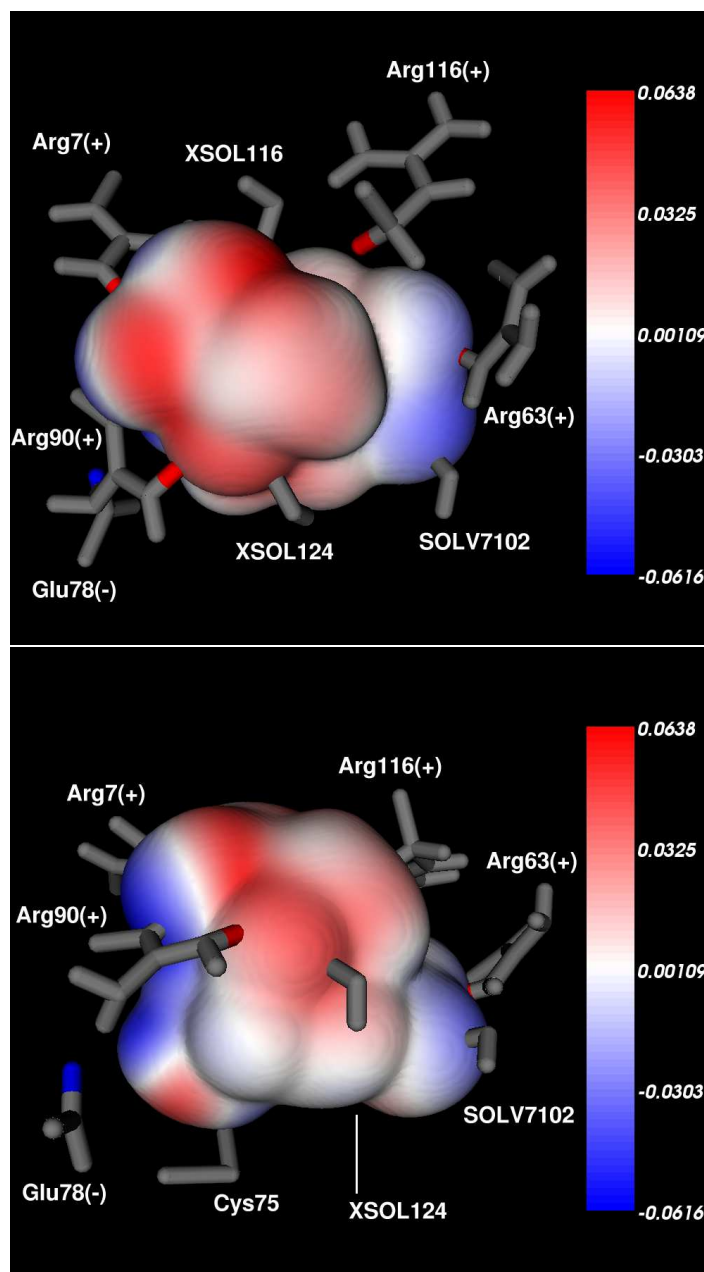
Znajomość statycznego pola katalitycznego z jednej strony umożliwia zaprojektowanie optymalnego katalizatora dla danej reakcji, a z drugiej strony może być narzędziem pomocnym w badaniach istniejącego katalizatora, takiego jak enzym. Przewaga oddziaływań o charakterze elektrostatycznym w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej, pozwala zastosować pola katalityczne do badania reakcji przegrupowania choryzmienu i porównać je ze strukturą centrum aktywnego.²⁷

Do wyznaczenia statycznego pola katalitycznego użyto struktur choryzmianu i stanu przejściowego zadokowanych w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej, z modelowania ścieżki reakcji metodą QM/MM. Były to te same struktury co stosowane w rozdziale 3.1, więc opis przygotowania tych struktur zostanie pominięty. Warto jedynie zaznaczyć, że struktura użyta jako substrat, to geometria zoptymalizowana w centrum aktywnym enzymu (a nie w fazie gazowej), czyli forma diaksjalna. Dzięki temu, z jednej strony wyklucza się z tego modelu efekty związane z preorganizacją czy też NAC, a z drugiej strony pole katalityczne nie jest obciążone niedokładnością wynikającą z niejednoznacznego nałożenia geometrii substratu i TS, bo są one do siebie podobne. Zarówno wartości potencjału elektrostatycznego jak i pola elektrycznego były wyznaczone za pomocą programu Gaussian,¹⁴² metodą Hartree-Focka, w bazie 6-31G(d). Wprawdzie możliwe jest wyznaczenie tych wartości na wyższym poziomie teorii, jednak biorąc pod uwagę wyniki prezentowane w rozdziale 3.1 (możliwość zaniedbania korelacji elektronowej oraz składowych delokalizacyjnej i wymiennej), taki opis uznano za wystarczający.

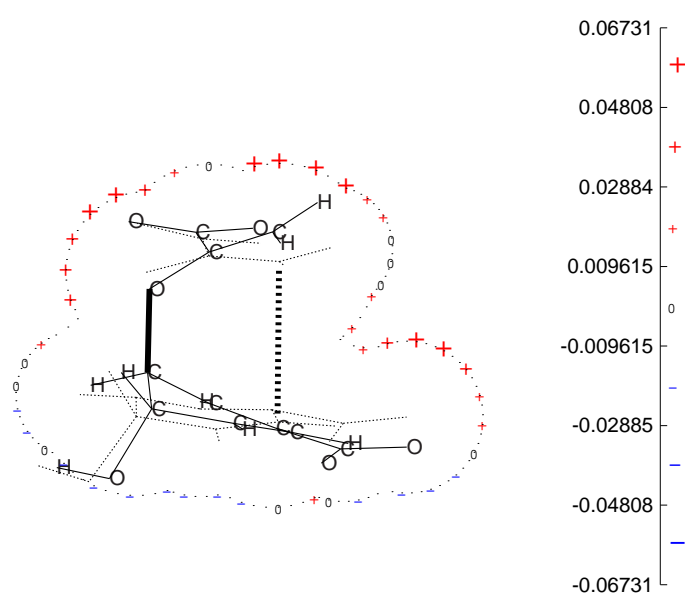
Trójwymiarowe statyczne pole katalityczne dla reakcji katalizowanej przez mutazę choryzmianową, przedstawione na rysunku 3.2 zostało wyznaczone programem napisanym specjalnie w tym celu, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 2.5. Z sumarycznego rozkładu gęstości elektronowej, obliczonej z plików CUBE wybrano powierzchnię o wartości $\rho_S + \rho_{TS} = 0.005$ a.u. Na tą powierzchnię naniesiono wartości różnicowego potencjału elektrostatycznego Δ_S wyznaczonego z plików CUBE z potencjałami substratu i TS. Wartości Δ_S zostały przedstawione za pomocą mapy kolorów.

Rysunek 3.3 przedstawia statyczne pole katalityczne przegrupowania choryzmianu do preferianu w postaci przekroju przez powierzchnię utworzoną przez wiązanie zrywane (C-O3) i tworzone (C3-C9). W tym przypadku wartości potencjału elektrostatycznego zostały wyliczone bezpośrednio w zadanych punktach programem Gaussian i przedstawione za pomocą znaków + (dodatnia wartość Δ_S) oraz - (ujemna wartość Δ_S). Wielkość znaku + lub - określa wartość bezwzględną Δ_S . Do obliczeń wybrano punkty rozmieszczone na powierzchni van der Waalsa, używając promienia 1.2 Å dla atomów wodoru, 1.7 Å dla atomów węgla i 1.4 Å dla atomów tlenu.

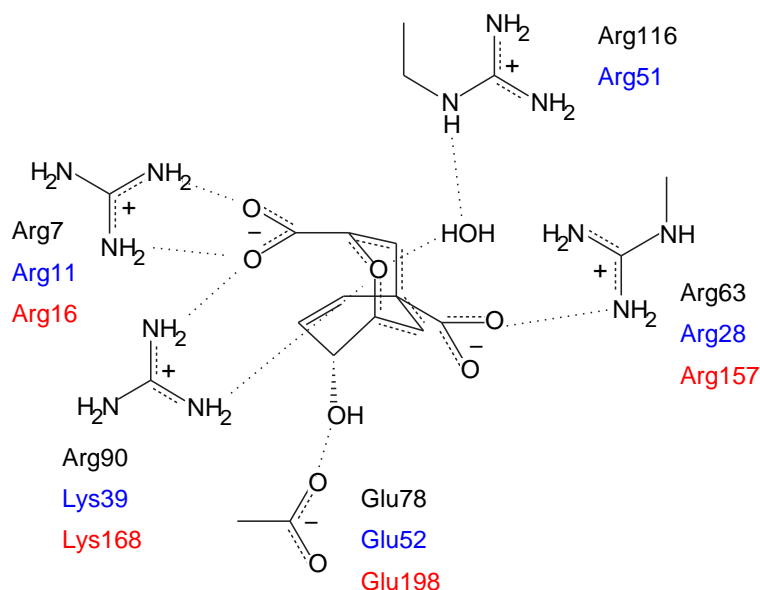
Wartości Δ_S , przedstawione, czy to za pomocą odpowiedniego koloru (rysunek 3.2), czy też za pomocą symbolu (rysunek 3.3), określają znak ładunku fragmentu otoczenia, który umieszczony w danym miejscu stabilizuje stan przejściowy względem substratu, a tym samym obniża barierę reakcji. Dodatkowo, wartość Δ_S określa względny wkład danego ładunku (fragmentu) do całkowitego obniżenia bariery. Jak wynika z analizy rozkładu wartości Δ_S na powierzchni otaczającej reagujący układ, odzwierciedlają one dość dobrze rozmieszczenie naładowanych reszt w centrum aktywnym. Dotyczy to przede wszystkim arginin Arg90 i Arg7 oraz glutaminianu Glu78. Jak pokazano w tabeli 3.3, właśnie te aminokwasy wnoszą największy wkład



Rysunek 3.2: Statyczne pole katalityczne reakcji przegrupowania choryzianu (widok z dwóch kierunków)



Rysunek 3.3: Statyczne pole katalityczne reakcji przegrupowania choryzmianu w płaszczyźnie wiązania zrywanego (C-O3, pogrubiona linia ciągła) i tworzonego (C3-C9, pogrubiona linia przerywana) w trakcie reakcji.



Rysunek 3.4: Porównanie wybranych reszt konserwatywnych w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej z organizmów *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae*, odpowiednio kolor czarny, niebieski i czerwony (na podstawie pracy Khanjina⁶⁸).

do obniżenia bariery, sięgający w przypadku argininy Arg90 aż 9 kcal/mol. Widać zatem, że struktura centrum aktywnego odpowiada teoretycznie wyprowadzonemu na podstawie pierwszych zasad mechaniki kwantowej, polu katalicznemu reakcji, która w tym centrum przebiega i stanowi optymalny katalizator dla tej reakcji. Co więcej, nie jest to przypadek, a skutek ewolucji enzymu, o czym świadczy porównanie badanego tutaj centrum aktywnego mutazy choryzmianowej z *Bacillus subtilis*⁸⁰ (BsCM) z centrami aktywnymi tego enzymu, wyizolowanego z innych organizmów – *Escherichia coli*⁵² (EcCM) oraz *Saccharomyces cerevisiae*⁸² (ScCM). Reszty zidentyfikowane tutaj jako wnoszące wkład do obniżenia bariery aktywacji okazują się mieć swoje odpowiedniki w różnych organizmach, co pokazuje rysunek 3.4. W miejscu, w którym w BsCM znajduje się glutaminian Glu78, w EcCM pojawia się glutaminian Glu52, a w ScCM — glutaminian Glu198. Podobnie, arginina Arg7 jest zastępowana przez Arg11 (EcCM) oraz Arg16 (ScCM), arginina Arg63 jest zastępowana przez Arg28 (EcCM) i Arg157 (ScCM), a arginina Arg90 przez również dodatnio naładowane lizyny — Lys39 (EcCM) i Lys168 (ScCM). Arginina Arg116 ma swój odpowiednik tylko w przypadku EcCM; jest nim arginina Arg51. Na tej podstawie można wysnuć ogólniejszy wniosek: pole katalityczne jest „matrycą” opisującą rozkład ładunku optymalny dla przebiegu danej reakcji, a enzymy, na drodze ewolucji, zostały do-

pasowane do tej „matrycy”. Ten optymistyczny wniosek oznacza, że naśladując ewolucję można użyć statycznego pola katalitycznego do zaprojektowania optymalnego katalizatora dla wybranej reakcji lub też „przeprogramowania” enzymu tak, aby katalizował reakcję z innymi substratami. Przedstawione podejście otwiera drogę do przewidywania uogólnionej struktury centrum aktywnego enzymu na podstawie katalizowanej reakcji — dzięki znajomości pola katalitycznego oraz konserwatywnych reszt znajdujących się w kilku enzymach katalizujących tę samą reakcję można przewidzieć przybliżone położenie tych reszt w przestrzeni otaczającej reagujący układ. W ten sposób można na przykład zweryfikować strukturę otrzymaną z modelowania przez homologię. Wyniki uzyskane w przypadku mutazy choryzmianowej są jednocześnie kolejnym dowodem na to, że prosty model oddziaływań elektrostatycznych daje w tym przypadku rozsądne wyniki, które dobrze zgadzają się ze strukturą krystalograficzną enzymu. Podobne rezultaty otrzymano metodą DTSS dla syntetazy tRNA¹⁶⁷ oraz kinazy białkowej.¹⁶⁸

Struktura substratu użytego w obliczeniach pola katalitycznego jest zbliżona pod względem geometrii do struktury stanu przejściowego i odpowiada strukturze NAC (długość wiązania C3–C9 wynosi 3.44 Å, czyli zgodnie z definicją³⁶ jest mniejsza niż 3.7 Å). Zasadnicze zmiany w geometrii choryzmianu zachodzą pomiędzy formą diekwatorialną, a diaksjalną, czyli w trakcie tworzenia kompleksu enzym–substrat. Pomiedzy strukturą związaną, a stanem przejściowym zachodzą już tylko niewielkie zmiany geometryczne, natomiast energia zmienia się w sposób znaczny (układ przechodzi przez barierę). Rysunek 3.2, przedstawiający statyczne pole katalityczne wyjaśnia naturę tych zmian — przyczyną istnienia bariery są duże zmiany w rozkładzie gęstości elektronowej spowodowane koniecznością zerwania i utworzenia wiązania. Obrazem tych zmian są niezerowe wartości różnicowego potencjału elektrostatycznego. Struktura NAC jest więc, przynajmniej w przypadku mutazy choryzmianowej, szczególnym punktem w przestrzeni konformacyjnej, rozdzielającą obszar dużych zmian geometrycznych od obszaru dużych zmian w strukturze elektronowej.

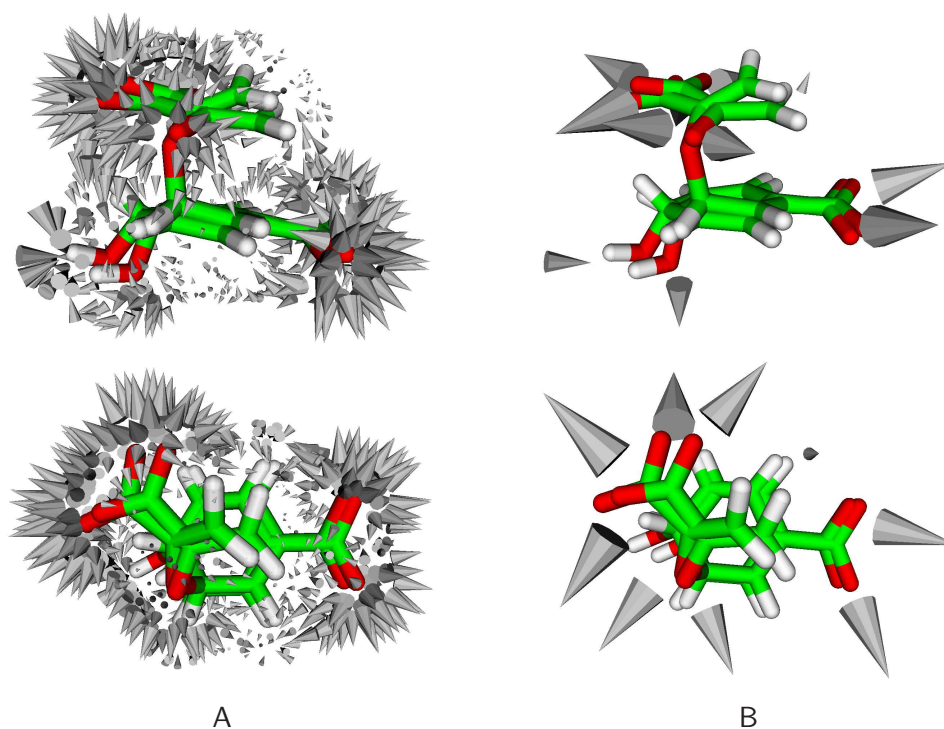
Statyczne pole katalityczne zostało również zastosowane do opisu oddziaływań w centrum aktywnym kinazy tiazolowej.¹⁶⁹ W tym przypadku pole katalityczne poprawnie przewiduje lokalizację jednego z kationów magnezu obecnych w centrum aktywnym. W miejscu, w którym znajduje się drugi kation, nie ma istotnych zmian w potencjale elektrostatycznym, co może oznaczać, że nie wnosi on istotnego wkładu do obniżenia bariery aktywacji albo, że jego obecność jest ekranowana przez sąsiadujące reszty asparagino-we. Pole katalityczne przewiduje obecność dodatnio naładowanej reszty w miejscu występowania argininy Arg121 oraz ujemnie naładowanego otoczenia w miejscu, w którym znajduje się obojętna cysteina. Co ciekawe, wiadomo z eksperymentów ukierunkowanej mutagenezy, że zastąpienie tej reszty inną, ujemnie naładowaną, zwiększa aktywność katalityczną tego enzymu.

3.3 Dynamiczne pole katalityczne mutazy choryzmianowej

Jak wspomniano w rozdziale 2.5, istnieją dwa rodzaje efektów obniżających barierę reakcji, mających charakter dynamiczny, czyli wynikający z przemieszczenia. Zewnętrzny efekt katalityczny nie jest bezpośrednio sprzężony ze współrzędną reakcji, a jego źródłem jest zależność energii oddziaływania w kompleksach katalizatora (reszty, enzymu, ...) z substratem i stanem przejściowym od odległości pomiędzy monomerami w tych kompleksach. Innymi słowy, bariera reakcji może mieć inną wysokość w zależności od tego, czy otoczenie katalityczne jest blisko czy daleko od reagującego układu. Wewnętrzny efekt katalityczny jest natomiast ściśle powiązany z dynamiką reakcji chemicznej w skali czasowej tej reakcji i wynika z fluktuacji odległości w układzie substrat/TS — katalizator. Tego rodzaju efekty mogą być łatwo przedstawione (i przewidywane) w postaci trójwymiarowej mapy wektorowej (rysunek 3.5). Stożki przedstawione na rysunku ilustrują wektory powstałe przez złożenie (sumę) wektorów gradientu potencjału elektrostatycznego V_S i V_{TS} . Przedstawiają one kierunki optymalnego ruchu dodatnich ładunków próbnych, które powodują obniżenie bariery aktywacji (optymalny ruch ujemnych ładunków powinien odbywać się w kierunku przeciwnym). Wewnętrzne pole katalityczne Δ_I przewiduje największy efekt związany z ruchem dodatnio naładowanego otoczenia w pobliżu grup karboksylowych i atomu O3. Jak pokazuje rysunek 2.2, w tych miejscach znajdują się dodatnio naładowane argininy: Arg7, Arg63, Arg90. Aby obniżyć barierę aktywacji powinny one zwiększać swoją odległość od reagującego układu w trakcie przebiegu reakcji. Nie jest to zgodne z obserwowanym w symulacjach QM/MM⁷⁷ skróceniem wiązań wodorowych w trakcie reakcji, jednak rozbieżność ta zostanie wyjaśniona na przykładzie argininy Arg90 w rozdziale 3.4. Pole Δ_I przewiduje również nieco mniejszy efekt związany ze zmniejszeniem odległości w pobliżu grupy hydroksylowej, jednak dotyczy on dodatniego ładunku próbnego. W tym miejscu znajduje się ujemnie naładowany glutaminian Glu78, dla którego — ze względu na przeciwny ładunek — ruch optymalny, to również (jak w przypadku arginin) zwiększenie odległości.

3.4 Konformacyjna stabilizacja stanu przejściowego

Przewidywania wynikające z dynamicznych pól katalitycznych mogą być zweryfikowane poprzez bezpośrednie obliczenia obniżenia bariery aktywacji w ramach metody DTSS, dla różnych konformerów kompleksu katalizator–substrat i katalizator–TS (katalizatorem jest w tym przypadku pojedyncza reszta lub enzym). W ten sposób sprawdzono wpływ odległości pomiędzy



Rysunek 3.5: Wewnętrzne pole katalityczne dla reakcji przegrupowania choryzmienu do prefenianu. (A) Wektory wewnętrznego pola katalitycznego Δ_I na powierzchni o stałej gęstości elektronowej $\rho = 0.005$ a.u.; (B) Wektory wewnętrznego pola katalitycznego Δ_I w punktach przecięcia powierzchni o stałej gęstości elektronowej $\rho = 0.005$ a.u. i najkrótszych kontaktów pomiędzy resztami wykazującymi największy wkład do Δ , a substratem/TS (rysunek 3.6).

Tabela 3.4: Wpływ orientacji grupy hydroksylowej w choryzmianie/TS na wysokość bariery aktywacji, mierzony wartością Δ (w kcal/mol) na poziomie metody MP2/6-31G(d). Orientację grupy hydroksylowej określa kąt dwuścienny H4–O–C1–C.

Konformer	Kąt Θ w kompleksie:		Δ_{MP2}
	Glu78 – choryzmian	Glu78 – TS	
I	250.0	250.0	0.12
II	80.0	80.0	-1.49
III	80.0	250.0	7.33
IV	250.0	80.0	-8.70

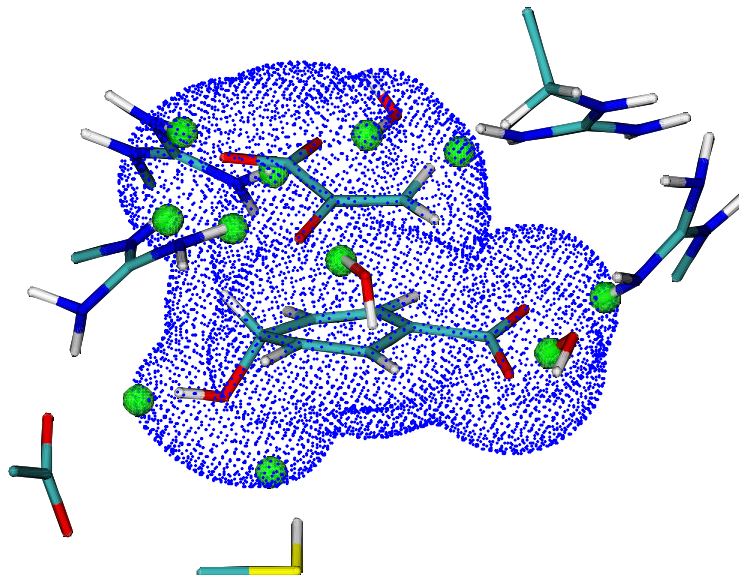
Tabela 3.5: Wpływ odległości Glu78–choryzmian/TS na obniżenie bariery aktywacji Δ (w kcal/mol) na poziomie metody MP2/6-31G(d). Kolumna „Kontakt” określa, w którą stronę zwrócony jest proton grupy hydroksylowej choryzmianu i TS. Odległość (w Å) mierzono pomiędzy atomami ciężkimi, czyli tlenem grupy hydroksylowej, a tlenem w Glu78 lub siarką w Cys75.

Konformer	Kontakt	Odległość w kompleksie:		Δ_{MP2}
		Glu78 – choryzmian	Glu78 – TS	
I	Cys75, S	4.24	3.88	2.62
II	Glu78, O	4.24	3.88	1.29
III	Glu78, O	2.85	2.82	0.22
IV	Glu78, O	4.24	2.82	5.08
V	Glu78, O	2.85	3.88	-3.57

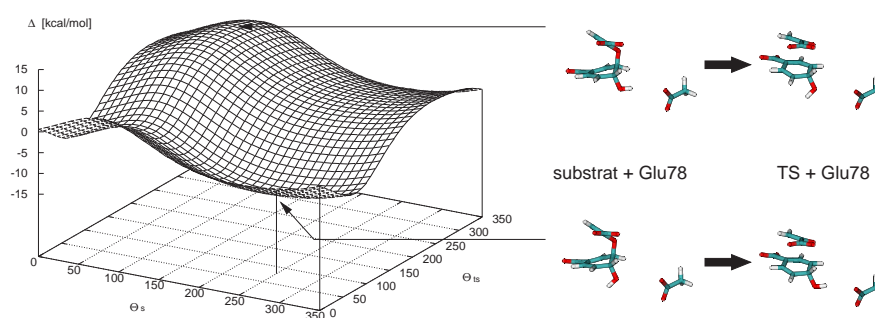
glutaminianem Glu78 i choryzmianem/TS na obniżenie bariery aktywacji oraz wpływ obrotu grupy hydroksylowej w choryzmianie. W centrum aktywnym mutazy choryzmianowej z *B. subtilis* znajdują się dwie reszty zdolne do utworzenia wiązania wodorowego z grupą hydroksylową — wspomniany glutaminian Glu78 oraz cysteina Cys75, dlatego istnieją dwie prawdopodobne orientacje tej grupy. Już prosty test, którego wyniki umieszczono w tabelach 3.4 i 3.5, pokazuje, że odległość od glutaminianu (r) i orientacja grupy hydroksylowej (kąt H4–O–C1–C) mają znaczący wpływ na obniżenie bariery aktywacji. Jak wynika z tabeli 3.4, obrót niewielkiej grupy hydroksylowej może dość istotnie wpływać na barierę reakcji. Optymalnym ze względu na jej obniżenie, jest konformer IV, w którym proton grupy hydroksylowej jest skierowany w pobliże atomu siarki cysteiny ($\Theta = 250.0$) w kompleksie z substratem oraz na atom tlenu w glutaminianie ($\Theta = 80.0$), w kompleksie ze stanem przejściowym. Oznacza to, że aby osiągnąć możliwe największe obniżenie bariery aktywacji, grupa hydroksylowa musi się obracać w trakcie reakcji. Efekt ten, w ramach nomenklatury stosowanej do opisu pól katali-

tycznych, należy zaklasyfikować jako wewnętrzny efekt dynamiczny. Uogólnienie tabeli 3.4 stanowi rysunek 3.7, przedstawiający zależność obniżenia bariery aktywacji Δ od kąta Θ w kompleksie z substratem (Θ_s) i stanem przejściowym (Θ_{ts}). Obliczenia wykonano na poziomie metody MP2 w bazie 6-31G(d), zmieniając wartości kąta Θ dla substratu i stanu przejściowego w zakresie od 0 do 350°, co 10°, a badany model składał się z choryzmianu lub TS i anionu kwasu octowego reprezentującego grupę karboksylową glutaminianu. Minimum na tym wykresie definiuje taką parę kątów Θ_S , Θ_{TS} , dla których obniżenie bariery aktywacji Δ jest największe. Są to wymienione wcześniej w tabeli 3.4, wartości $\Theta_S = 250.0$ oraz $\Theta_{TS} = 80.0$, odpowiadające obrotowi grupy hydroksylowej od cysteiny do glutaminianu. Na rysunku 3.7 pokazano również strzałką maksimum, które odpowiada przeciwnemu ruchowi — najbardziej niekorzystnemu, ze względu na obniżenie Δ . Ze względu na duży koszt obliczeniowy, skan powierzchni Δ przeprowadzono w modelu, który zawierał tylko choryzmian/TS i anion octanowy, jako model glutaminianu, natomiast nie zawierał cysteiny. Biorąc pod uwagę możliwą zmianę kształtu powierzchni Δ po uwzględnieniu cysteiny (jako etanotiolu), obliczono później zależność Δ od kąta Θ w rozszerzonym modelu, również na poziomie metody MP2 w bazie 6-31G(d) (rysunek 3.8). Wyniki dokładniejszych obliczeń nie zmieniają wniosków dotyczących rotacji grupy hydroksylowej — chociaż obecność cysteiny zmienia nieco kształt powierzchni, jednak nie wpływa na jej ogólny charakter i położenie ekstremów nie zmienia się znacząco. Ważną obserwacją może być fakt, że rotacja grupy hydroksylowej powoduje dramatyczną zmianę wartości Δ i może wpływać hamująco lub przyspieszająco na przebieg reakcji.

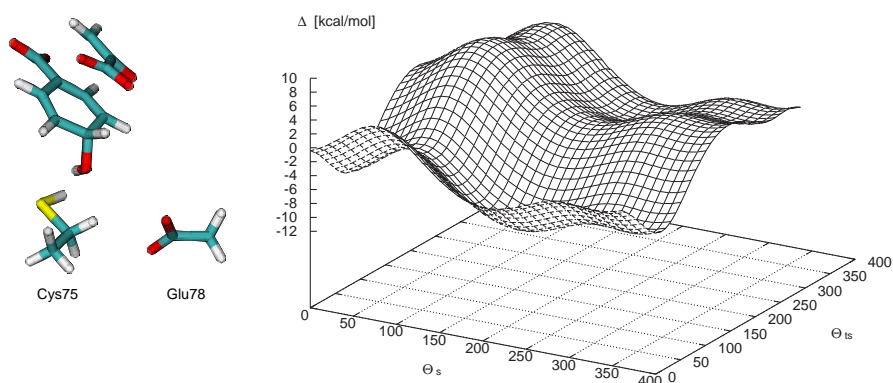
W podobny sposób przebadano wpływ odległości glutaminianu Glu78 od choryzmianu/TS (tabela 3.5 i rysunek 3.9). W tym przypadku również stosowano model składający się z choryzmianu lub TS i anionu kwasu octowego, zastępującego glutaminian, a odległość r w obu kompleksach zmieniano co 0.1 Å. Podjęcie obliczeń optymalnej odległości dla glutaminianu Glu78 poddyktowane zostało rozbieżnością pomiędzy wartością r dla modelu QM/MM używanego w niniejszej pracy⁷⁷ i wartościami cytowanymi w literaturze.⁷⁴ W pracy Y. S. Lee⁷⁴ wartości r_S i r_{TS} wynosiły odpowiednio 2.85 i 2.82 Å, a wkład glutaminianu Glu78 do obniżenia bariery aktywacji wynosił około -4 kcal/mol (metoda HF/4-31G), podczas gdy w modelu QM/MM stosowanym tutaj, odległości te wynosiły odpowiednio 4.24 i 3.88 Å, a wkład glutaminianu do Δ wynosił 0.79 kcal/mol na poziomie HF/6-31G(d) oraz 2.62 kcal/mol na poziomie MP2/6-31G(d), czyli był inhibicyjny. Należy zaznaczyć, że zastosowanie odległości podanych przez Lee⁷⁴ (2.85 i 2.82 Å) również nie prowadzi do efektu katalitycznego, gdyż wprawdzie na poziomie HF/6-31G(d) wkład glutaminianu do Δ wynosi -2.92 kcal/mol (co jest w pewnym stopniu zgodne z cytowaną powyżej wartością -4 kcal/mol), jednak już na poziomie metody MP2/6-31G(d) wynosi on 0.22 kcal/mol. Jak pokazuje tabela 3.5, żadna z tych par nie jest optymalna ze względu na ob-



Rysunek 3.6: Najkrótsze kontakty w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej. Zielone sfery oznaczają punkty przecięcia powierzchni o stałej gęstości elektronowej $\rho = 0.005$ a.u. (niebieskie punkty) z najkrótszymi kontaktami pomiędzy resztami wykazującymi największy wkład do Δ , a TS.



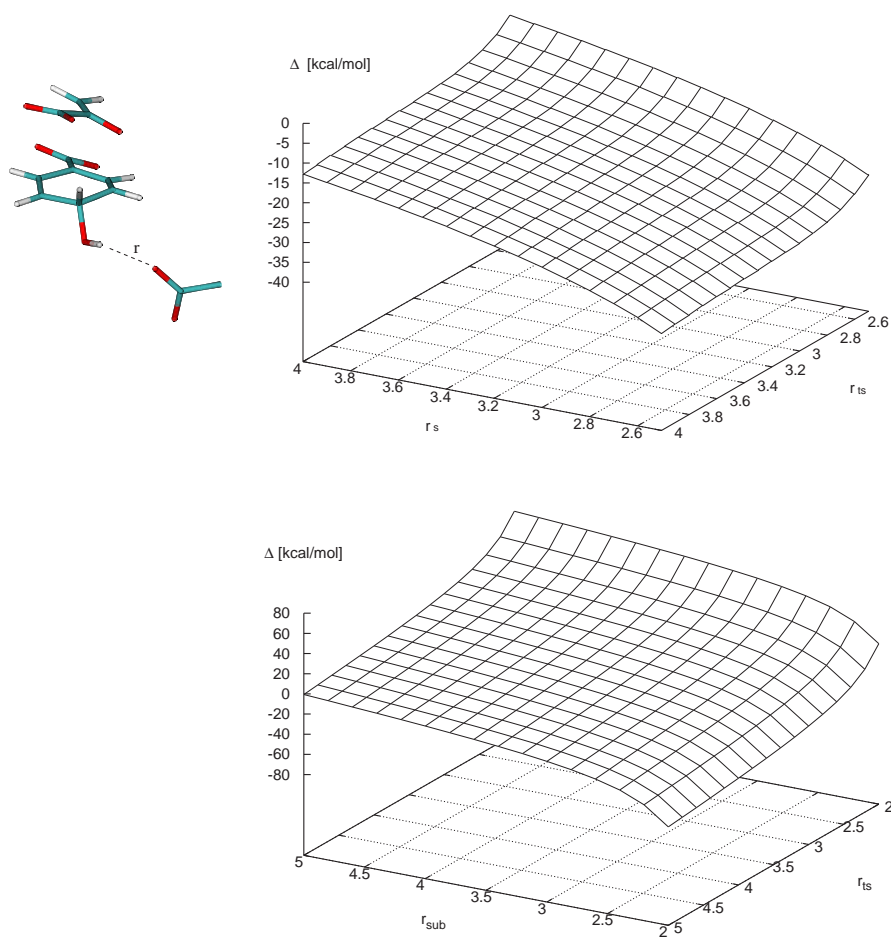
Rysunek 3.7: Wpływ konformacji grupy hydroksylowej choryzmianu/TS na obniżenie bariery aktywacji, Δ (MP2/6-31G(d)). Kąt Θ (w stopniach) określa wartość kąta dwuściennego H4-O-C1-C w substracie (S) i stanie przejściowym (TS).



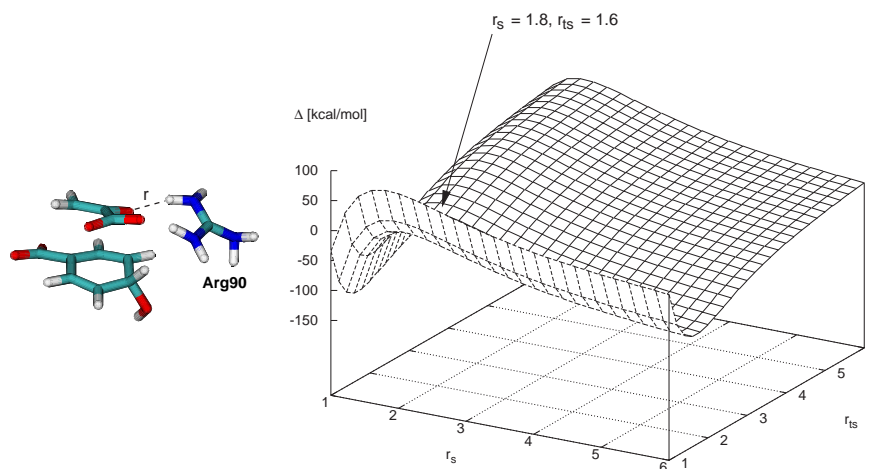
Rysunek 3.8: Wpływ konformacji grupy hydroksylowej choryzmianu/TS na obniżenie bariery aktywacji, Δ w obecności cysteiny (MP2/6-31G(d)). Kąt Θ wyrażony w stopniach.

niżenie bariery aktywacji. Spośród wariantów wymienionych w tabeli 3.5, najbardziej korzystny jest wariant V, uwzględniający zmianę odległości — z mniejszej r_S do większej r_{TS} . Dlatego właśnie w obliczeniach wkładów do obniżenia bariery aktywacji (rozdział 3.1) stosowano model V kompleksu z glutaminianem. Wynik ten jest zgodny z przewidywaniami wewnętrznego pola katalitycznego (rysunek 3.5), które przewiduje, że ruch ujemnie naładowanego otoczenia w miejscu, w którym znajduje się glutaminian, polegający na odsuwaniu tego otoczenia, będzie obniżał barierę aktywacji. Jest to wynik dość oczywisty, wobec równania 2.2 i tego, że zarówno choryzmian/TS jak i glutaminian są ujemnie naładowane. Z równania 2.2 wynika, że Δ jest tym niższa im niższa jest wartość ΔE_{ETS} (silniejsze jest oddziaływanie w kompleksie ze stanem przejściowym) lub im wyższa jest wartość ΔE_{ES} (silniejsza jest destabilizacja substratu). Dlatego właśnie proste rozważania oparte na prawie Coulomba, traktujące substrat/TS i glutaminian jako ładunki punktowe, prowadzą do wniosku, że zwiększanie odległości r w trakcie reakcji prowadzi do zmniejszenia destabilizacji w układzie, a tym samym do obniżenia bariery aktywacji (ilustruje to rysunek 2.4B). Ogólną zależność obniżenia bariery aktywacji Δ od r ilustruje rysunek 3.9, przy czym należy pamiętać, że obecność otoczenia w postaci enzymu nakłada ograniczenia na ruch reszty, więc prawdopodobnie jest on możliwy w znacznie mniejszym zakresie niż wynika to z wykresu. Podobnie jak obrót grupy hydroksylowej, również przewidywany ruch glutaminianu ma charakter wewnętrznego, dynamicznego efektu katalitycznego.

Wpływ odległości reszty od substratu/TS zbadano również w przypadku Arg90, aminokwasu, który tworzy dwa silne wiązania wodorowe z substratem i ma największy wkład do obniżenia bariery aktywacji. W tym przy-



Rysunek 3.9: Wpływ odległości glutaminianu Glu78 od choryzmianu/TS na obniżenie bariery aktywacji (MP2/6-31G(d)). Górny wykres: konformer optymalny ze względu na obrót grupy hydroksylowej (numer IV w tabeli 3.4); dolny wykres: konformer I (tabela 3.4) — proton w grupie hydroksylowej obrócony w stronę cysteiny Cys75. Odległość r w Å.



Rysunek 3.10: Wpływ odległości pomiędzy arginina Arg90, a substratem (r_S) i stanem przejściowym (r_{TS}). Odległości wyrażone są w Å i w tym przypadku mierzone są pomiędzy atomami O i H. Strzałką zaznaczono punkt siodłowy.

padku otrzymano powierzchnię Δ o zupełnie innym kształcie (rysunek 3.10). Optymalna odległość dla kompleksu ze stanem przejściowym (r_{TS}) wynosi około 1.6 Å, natomiast dla kompleksu z substratem niższe wartości Δ są osiągane przy małych odległościach $r_S \sim 1$ Å oraz przy odległościach znacznie większych, $r_S \sim 6$ Å. Wynika z tego, że bariera aktywacji może być obniżona przez ruch argininy Arg90 na krótkim odcinku od 1 do 1.6 Å (zwiększenie odległości) lub przez skrócenie odległości — na przykład pomiędzy ~ 2 Å, a 1.6 Å. Z symulacji QM/MM⁷⁷ wynika, że w przypadku Arg90 istotnie obserwuje się znaczne skrócenie wiązania wodorowego z ~ 1.95 Å do ~ 1.75 Å, co odpowiada drugiemu przypadkowi. Wewnętrzne pole katalityczne Δ_I przewiduje bardzo duży efekt związany z ruchem argininy Arg90, jednak w przeciwnym kierunku niż obserwowany w symulacji QM/MM. Tą pozorną rozbieżność wyjaśnia fakt, że powierzchnia o stałej gęstości elektronowej $\rho = 0.005$ a.u. (rysunek 3.6) znajduje się w odległości 1.55 Å od atomu O3, a zatem przed punktem siodłowym, który znajduje się w odległości 1.8 ± 0.2 Å. Ruch obserwowany w symulacjach QM/MM odbywa się za punktem siodłowym, czyli w obszarze, w którym optymalny jest ruch w przeciwnym kierunku. Wniosek ten, jest ostrzeżeniem dotyczącym stosowalności pól katalitycznych — zwłaszcza dynamicznych. Jak widać, są one bardzo wrażliwe na umiejscowienie powierzchni i wnioski dotyczące optymalnego ruchu są poprawne tylko dla punktu, w którym wyznaczono wektor. Wszelkie uogólnienia muszą być dokonywane z daleko idącą ostrożnością.

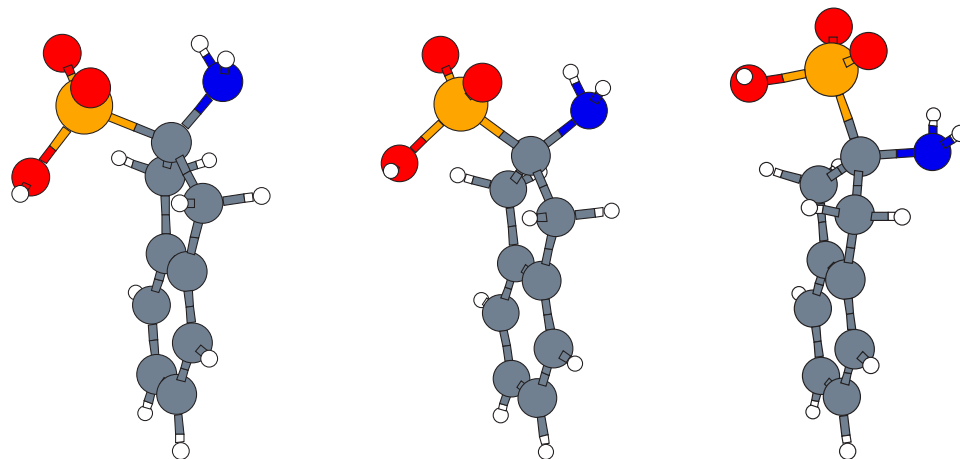
Tabela 3.6: Energia formy AC i stanu przejściowego (TS) względem formy EC dla możliwych stanów sprotonowania AIP (energia wyrażona jest w kcal/mol). Formy AC-e i AC-f nie istnieją w fazie gazowej.

Forma	AC	TS	EC
(a) $-\text{NH}_3^+$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$	4.41	4.86	0.0
(b) $-\text{NH}_2$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$	2.70	3.35	0.0
(c) $-\text{NH}_3^+$, $-\text{PO}_3\text{H}^-$	4.24	4.66	0.0
(d) $-\text{NH}_2$, $-\text{PO}_3\text{H}^-$	1.72	2.00	0.0
(e) $-\text{NH}_3^+$, $-\text{PO}_3^{-2}$	—	—	0.0
(f) $-\text{NH}_2$, $-\text{PO}_3^{-2}$	—	—	0.0

3.5 Inhibicja amoniakolizy fenyloalaninowej

Analiza rentgenowska kryształów inhibitora AIP (rysunek 1.5) amoniakolizy fenyloalaninowej wykazała, że w ciele stałym cząsteczki AIP są zgięte, a atom węgla C2, do którego przyłączone są grupy funkcyjne jest odchyłony od płaszczyzny pierścienia o około 0.4 \AA .⁷¹ W tej konformacji grupa aminowa znajduje się w pozycji aksjalnej, natomiast większa grupa fosfonowa znajduje się w pozycji ekwatorialnej (dlatego ta konformacja będzie oznaczana jako EC). Obie grupy są zjonizowane ($-\text{NH}_3^+$ oraz $-\text{PO}_3\text{H}^-$). W sumie, AIP może występować w dwunastu formach w zależności od konformacji (ekwatorialna, EC lub aksjalna, AC) i stanu sprotonowania grup funkcyjnych: (a) $-\text{NH}_3^+$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, (b) $-\text{NH}_2$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, (c) $-\text{NH}_3^+$, $-\text{PO}_3\text{H}^-$, (d) $-\text{NH}_2$, $-\text{PO}_3\text{H}^-$, (e) $-\text{NH}_3^+$, $-\text{PO}_3^{-2}$, (f) $-\text{NH}_2$, $-\text{PO}_3^{-2}$. Geometrie AC i EC wraz ze strukturą stanu przejściowego przedstawione są na rysunku 3.11.

Geometrię wszystkich dwunastu struktur wyznaczano teoretycznie posługując się programem Gaussian,¹⁴² na poziomie metody Hartree-Focka, w bazie 6-31G(d). Tabela 3.6 przedstawia energie poszczególnych form AIP. Wyniki tych obliczeń wskazują na to, że preferowana (w fazie gazowej) jest forma EC i to bez względu na stan sprotonowania grup funkcyjnych. Ponadto, skrajnie zasadowe formy aksjalne (AC-e i AC-f) najprawdopodobniej nie istnieją w fazie gazowej, bo nie udało się zlokalizować odpowiednich minimów. Istnienie pozostałych form aksjalnych również nie jest pewne, bo wprawdzie udało się wyznaczyć minima i stany przejściowe, jednak różnica energii pomiędzy odpowiednimi formami AC i EC jest niewielka (1.7 do 4.4 kcal/mol). Bariera energetyczna w żadnym przypadku nie przekacza 1 kcal/mol, a częstości urojone w poszczególnych stanach przejściowych są stosunkowo niskie: 47.35 cm^{-1} (TS-a), 47.79 cm^{-1} (TS-b), 43.86 cm^{-1} (TS-c), 40.70 cm^{-1} (TS-d), co wskazuje na łagodny kształt tej bariery. Obliczenia zostały zweryfikowane na wyższych poziomach teorii, to znaczy DFT/B3LYP i MP2, a zestawione wyniki znajdują się w tabeli 3.7. W przypadku metody



Rysunek 3.11: Geometria form AC-d, TS-d i EC-d inhibitora AIP, obliczona na poziomie metody HF/6-31G(d).

Tabela 3.7: Względne energie form AC, TS, EC inhibitora AIP na różnych poziomach teorii. Wartości energii wyrażono w kcal/mol. Forma (c) nie została znaleziona na poziomie metody DFT.

Forma	AC	TS	EC
(b) -NH ₂ , -PO ₃ H ₂			
HF	2.70	3.35	0.0
DFT/B3LYP	2.16	3.12	0.0
MP2	2.32	4.57	0.0
(c) -NH ₃ ⁺ , -PO ₃ H ⁻			
HF	4.24	4.66	0.0
DFT/B3LYP	—	—	—
MP2	2.22	4.62	0.0
(d) -NH ₂ , -PO ₃ H ⁻			
HF	1.72	2.00	0.0
DFT/B3LYP	0.87	1.46	0.0
MP2	1.26	2.62	0.0

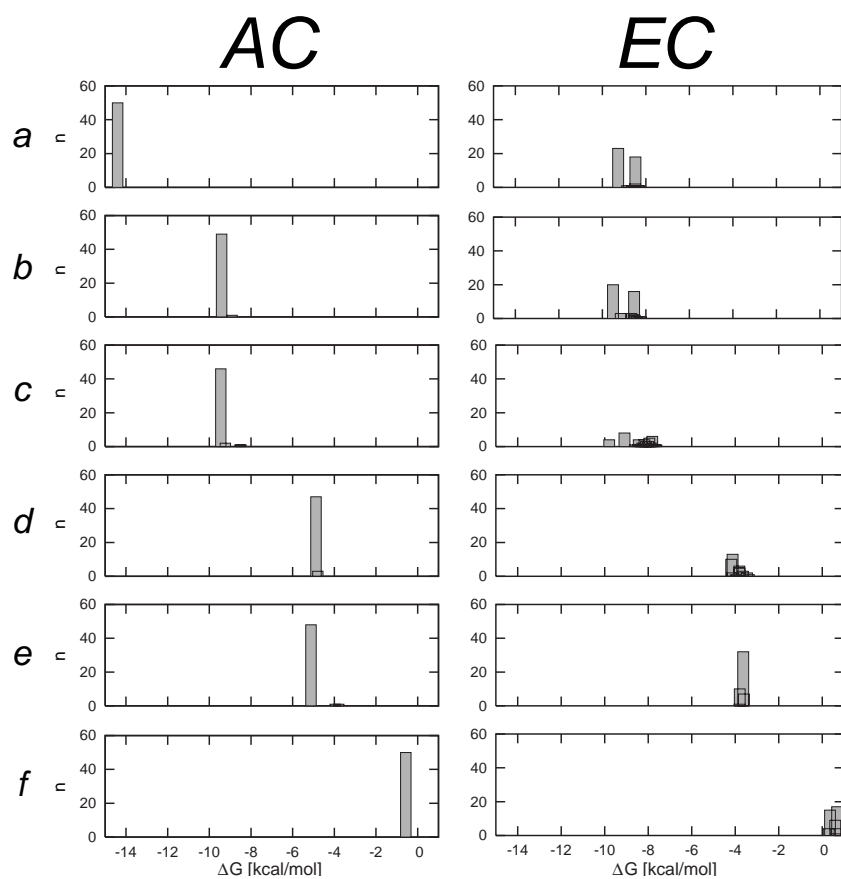
Tabela 3.8: Dokowanie form AC-, EC-, a-f inhibitora AIP do centrum aktywnego PAL. Wartości energii odpowiadają entalpii wiązania i są wyrażone w kcal/mol.

Forma	Liczba klast.	Rozmiar najw. klastera	Najniższa energia	Najniższa energia w najw. klasterze	Średnia energia najw. klastera
AC-a	1	50	-14.40	-14.40	-14.37
AC-b	2	49	-9.41	-9.41	-9.33
AC-c	4	46	-9.45	-9.45	-9.31
AC-d	2	47	-4.88	-4.88	-4.75
AC-e	3	48	-5.12	-5.12	-5.04
AC-f	1	50	-0.57	-0.57	-0.54
EC-a	10	23	-9.27	-9.27	-9.19
EC-b	10	20	-9.51	-9.51	-9.29
EC-c	19	8	-9.79	-9.09	-9.05
EC-d	12	13	-4.18	-4.12	-3.98
EC-e	4	32	-3.80	-3.63	-3.62
EC-f	6	17	+0.30	+0.69	+0.71

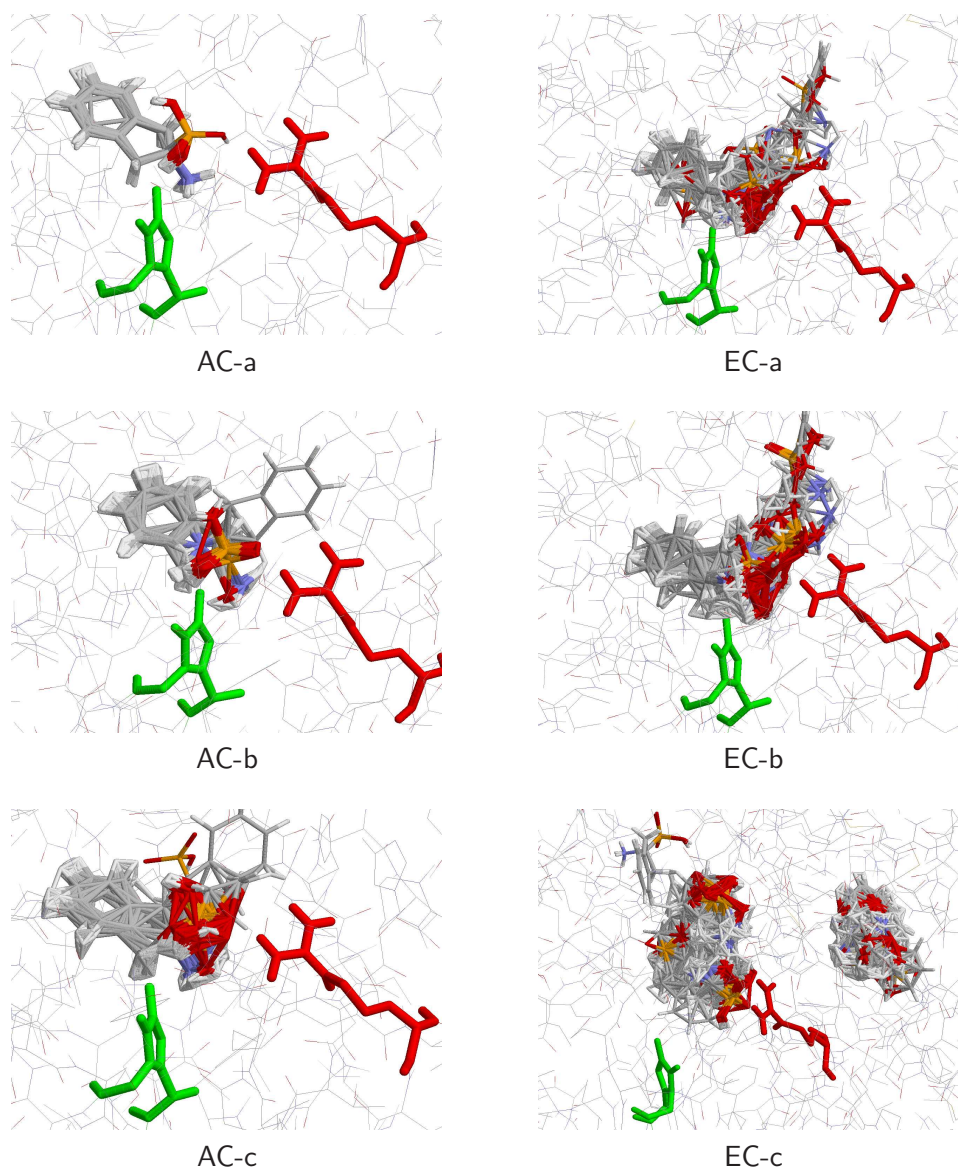
DFT nie udało się zlokalizować żadnego minimum dla formy (c), która w wyniku optymalizacji zbiegała do odpowiedniej formy (b). Podobnie dzieje się na poziomie MP2, jeśli użyje się bazy funkcyjnej z dodatkowymi funkcjami rozmytymi i polaryzacyjnymi (np. 6-311++G(d,p)). Można spodziewać się, że w roztworze wodnym formy zwitterjonowe są stabilizowane przez rozpuszczalnik i mimo to istnieją. Na wyższych poziomach teorii nie daje się zauważyć, żadnych jakościowych zmian w równowadze form AC i EC, zatem wyniki te nie zmieniają w żaden sposób przedstawionych powyżej wniosków.

Badania AIP techniką NMR dowiodły,⁷¹ że obliczenia dla fazy gazowej częściowo odzwierciedlają to co dzieje się w roztworze. Wynika z nich, że obydwie formy znajdują się w równowadze, która znacznie przesuwa się w stronę formy EC w środowisku zasadowym, natomiast w środowisku silnie kwaśnym przeważa forma AC.

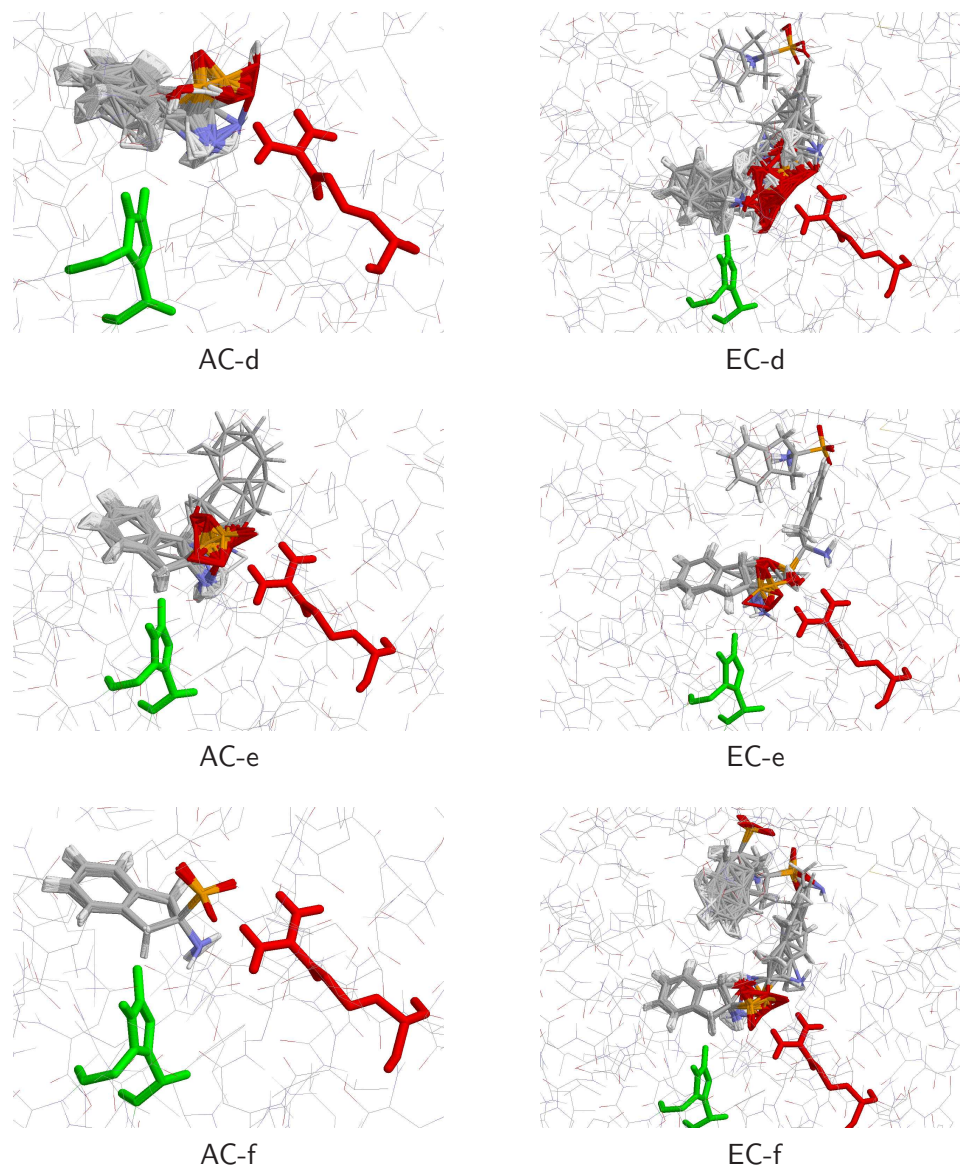
Stosując procedurę opisaną w rozdziale 2.6, przeprowadzono dokowanie wszystkich dwunastu struktur. Ponieważ struktur AC-e i AC-f nie znaleziono w fazie gazowej, ale mogą one być stabilne w formie związanej w enzymie, przygotowano je poprzez usunięcie jednego lub dwóch protonów z formy AC-c. Wyniki dokowania wszystkich form AIP podsumowano w tabeli 3.8 oraz na rysunku 3.12. Analizując tabelę i wykresy, daje się w nich zauważyć, że formy aksjalne, w przeciwieństwie do ekwatorialnych tworzą pojedyncze, duże klasterzy. Porównanie tych klasterów jest przedstawione na rysunku 3.13.



Rysunek 3.12: Histogramy ilustrujące ilość i wielkość klasterów konformacji dla dwunastu form AIP zadokowanych w PAL.



Rysunek 3.13: Rezultat dokowania dwunastu form inhibitora AIP do enzymu PAL. Zielonym kolorem oznaczono grupę prostetyczną MIO, czerwonym — argininę Arg354. (ciąg dalszy na stronie 66)



Rysunek 3.13: (kontynuacja ze strony 65)

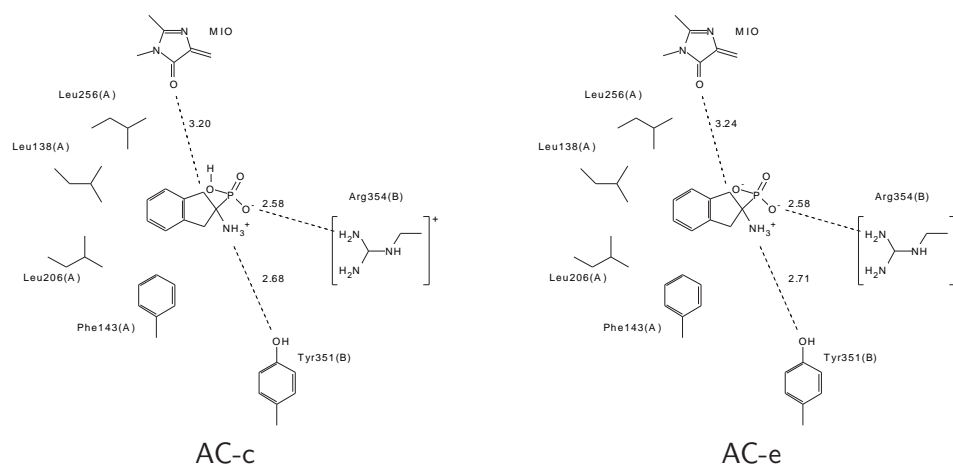
Klasterzy formy AC są we wszystkich przypadkach ulokowane w centrum aktywnym, w taki sposób, że grupa fosfonowa jest skierowana w kierunku dodatnio naładowanej argininy Arg354 i tworzy z nią wiązanie wodorowe. Reszta Arg354 bierze również udział w wiązaniu substratu i stanu przejściowego w katalizowanej reakcji i — jak można się domyślać — zapewnia właściwe ustawienie grup odchodzących względem reszty enzymu. Pierścień aromatyczny nie jest ustawiony tak jak pierścień fenylowy¹⁰⁴ w substracie, to znaczy nie przylega do grupy metylenowej MIO, co może wynikać z tego, że AIP nie jest wystarczająco dobrym analogiem stanu przejściowego.

Na podstawie eksperymentów (NMR i krystalografii) oraz modelowania, można zauważyć, że stabilną konformacją AIP zarówno w roztworze jak i w ciele stałym, jest konformacja ekwatorialna. Tylko w enzymie stabilniejszą wydaje się być konformacja aksjalna, a to oznacza, że enzym wiąże inhibitor w konformacji o wyższej energii niż konformacja znajdująca się w minimum dla roztworu. Spośród zbioru cząsteczek znajdujących się w roztworze w różnych konformacjach zgodnie z rozkładem Boltzmanna, enzym wybiera te, które mają ściśle określoną konformację aksjalną. Taka selektywność konformacyjna jest również obserwowana w przypadku wiązania substratu (choryzmianu) przez mutazę choryzmianową^{96,37,28,61,34} i w przypadku katalizy jest uważana za jeden z czynników odpowiedzialnych za przyspieszenie reakcji. W tym przypadku, selektywność konformacyjna może mieć również wpływ na inhibicję. Zauważono, że wiązanie AIP do PAL przebiega wolniej niż wiązanie kwasu 2-aminooksy-3-fenylopropanowego¹⁷⁰ (stała asocjacji jest około 20 razy mniejsza dla AIP, podczas gdy stałe dysocjacji są porównywalne). Możliwe, że za wolniejsze wiązanie jest odpowiedzialna konieczność wychwycenia przez enzym z roztworu cząsteczek w niestabilnej konformacji, których jest statystycznie mniej. Przyjmując względne energie obliczone w fazie gazowej dla stanu protonacji (d) stosunek ilości cząsteczek w konformacji EC do ilości cząsteczek w konformacji AC można oszacować na:

$$\frac{EC}{AC} = \frac{e^{-E_{EC}/RT}}{e^{-E_{AC}/RT}} = 7.2 \quad (3.1)$$

(zaniedbano tutaj wszystkie wkłady do entalpii swobodnej z wyjątkiem energii wewnętrznej i przyjęto $T = 298K$). Zatem z tej prostej oceny wynika, że formy AC jest około siedem razy mniej niż formy EC.

Na podstawie wyników dokowania AIP, można stwierdzić, że jest on inhibitorem kompetycyjnym, wiążącym się w centrum aktywnym i konkurującym z substratem o miejsce wiązania. Według mechanizmu reakcji uwzględniającego utworzenie wiązania pomiędzy pierścieniem aromatycznym, a grupą MIO, substrat tworzy wiązanie wodorowe pomiędzy grupą karboksylową, a arginina Arg354.¹⁰⁴ Ta reszta jest prawdopodobnie odpowiedzialna za ustawienie substratu we właściwej konformacji — podobną rolę pełnią argininy w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej. Analogicznie do substratu, inhibitor AIP również tworzy wiązanie z Arg354, we wszystkich



Rysunek 3.14: Odległości w kompleksach PAL z inhibitorem AIP

formach AC (przykładowe odległości dla form AC-c i AC-e przedstawione są na rysunku 3.14). Ze względu na ograniczenia metody dokowania, nie jest możliwe sprawdzenie, czy mógłby on utworzyć wiązanie kowalencyjne z grupą MIO. W przeciwieństwie do substratu, czy też kompleksu σ ,¹⁰⁴ AIP nie tworzy wiązania wodorowego pomiędzy grupą aminową, a grupą karboksylową tyrozyny Tyr110, lecz tworzy wiązanie wodorowe z tyrozyną Tyr351, która w reakcji pełni rolę akceptora odchodzącego protonu.

3.6 Międzycząsteczkowe przeniesienie ładunku

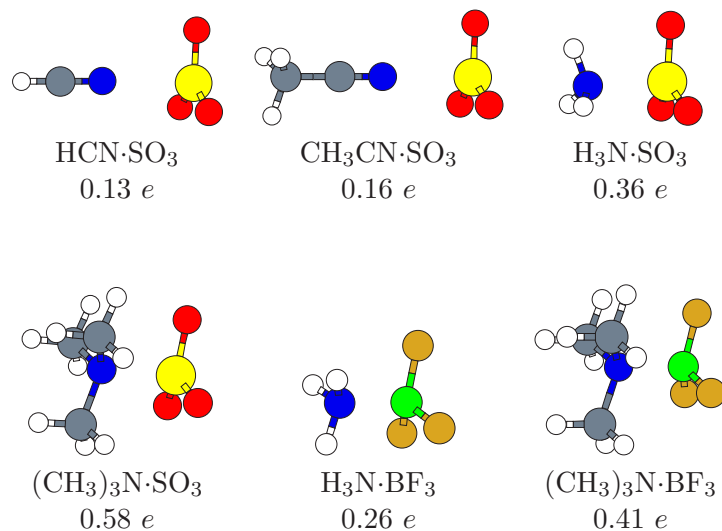
Metody teoretycznego wyznaczania wielkości międzycząsteczkowego przeniesienia ładunku (CT) były testowane na sześciu kompleksach typu kwas–zasada Lewisa: $\text{HCN}\cdot\text{SO}_3$, $\text{CH}_3\text{CN}\cdot\text{SO}_3$, $\text{H}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, $\text{H}_3\text{N}\cdot\text{BF}_3$ i $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{BF}_3$, dla których dostępne są eksperymentalne wartości CT w fazie gazowej (rysunek 3.15).

Geometrie wszystkich kompleksów zostały zoptymalizowane metodą MP2 w bazie funkcyjnej 6-31+G(2d,p). Następnie, obliczano wartość CT metodami opisanymi w rozdziale 2.7. Stosowano bazy funkcyjne Dunninga cc-pVXZ (X = D, T, Q) oraz poziomy teorii Hartree-Focka, DFT (z funkcjonałem B3LYP), Møllera-Plesseta drugiego rzędu oraz sprzężonych klastrów z podwójnymi wzbudzeniami. Obliczenia te wykonano w programie Gaussian,¹⁴² a ładunki punktowe wyznaczano metodami: analizy populacyjnej Mullikena,¹¹⁵ NPA,¹⁵⁶ AIM,¹⁵⁵ Chelp¹⁵⁷ i Chelpg.¹⁵¹ Wyniki tych obliczeń zestawione są w tabelach 3.9, 3.10, 3.11 i 3.12. Dla wszystkich kombinacji stosowanych modeli ładunków punktowych, metod i baz funkcyjnych obliczono średni błąd względny teoretycznych wartości CT w odniesieniu do wartości

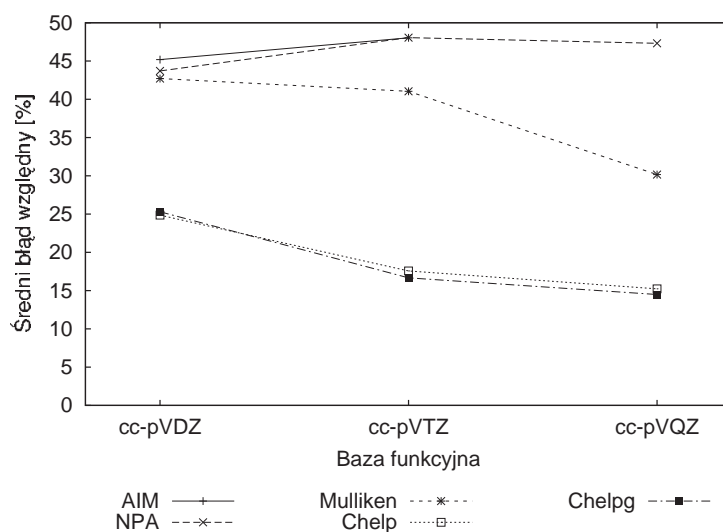
zmierzonych (tabela 3.13), który w przypadku popularnych metod — analizy populacyjnej Mullikena, metody NPA oraz metody AIM sięga 50 %. Na podstawie obliczeń można zaobserwować następujące tendencje: bez względu na użytą metodę i bazę, modele Chelp i Chelpg dają najmniejszy błąd — waha się on w granicach 25–28 % w bazie funkcyjnej cc-pVDZ oraz 14–21 % w bazach cc-pVTZ i cc-pVQZ (rysunek 3.16). Widać również, że wynik uzyskany metodami Chelp i Chelpg szybko wysyca się ze wzrostem bazy funkcyjnej. W przypadku analizy populacyjnej Mullikena dopiero zastosowanie dużej bazy funkcyjnej (cc-pVQZ) obniża błąd w sposób wyraźny, jednak nigdy nie wynosi on mniej niż 30 %. Silna zależność analiz populacyjnych od rozmiaru bazy jest faktem znanym i wzmiankowanym nawet w podręcznikach chemii obliczeniowej.^{22,158} Niestety, w większości pakietów do obliczeń kwantowo-mechanicznych, takich jak na przykład Gaussian¹⁴² jest to domyślna metoda wyznaczania ładunków punktowych i dlatego wielu użytkowników stosuje ją z bazami takimi jak na przykład baza 6-31G* Pople’a nie biorąc pod uwagę silnej zależności od rozmiaru bazy, a trzeba zaznaczyć, że baza 6-31G* jest mniejsza nawet od bazy cc-pVDZ. Ponieważ stosowanie większych baz funkcyjnych może być w wielu wypadkach niemożliwe, lepszym rozwiązaniem jest zastosowanie modelu ładunków punktowych, który szybciej ulega nasyceniu w miarę powiększania bazy (na przykład Chelpg) i jest oparty na dobrze zdefiniowanych wartościach spodziewanych potencjałów elektrostatycznych.

Metody NPA i AIM wykazują bardzo duży błąd — rzędu 50 %, jednak ich zależność od wielkości bazy jest znikoma. Ponadto metoda AIM wykazuje jedynie błąd systematyczny — odchylenie od wartości eksperymentalnych jest wprawdzie znaczne, ale jednakowe w przypadku czterech zbadanych kompleksów (rysunek 3.17). Można ten fakt tłumaczyć tym, że metoda Townesa i Dailey’a oszacowuje raczej górną granicę CT niż dokładną wartość. Efekt ten jest również widoczny jeśli porównuje się współczynnik korelacji z eksperymentalnymi wartościami CT (rysunek 3.18): jest on największy w przypadku metody AIM, i już w najmniejszej bazie funkcyjnej (cc-pVDZ) wynosi ponad 0.9, dlatego metoda ta, może być z powodzeniem stosowana w analizie porównawczej. Wadą metody AIM jest dość skomplikowany algorytm wyszukiwania powierzchni rozdzielających baseny atomowe, który czasem zawodzi dla układów o skomplikowanej topologii, takich jak na przykład kompleks $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$. Porównywalnie wysoki współczynnik korelacji obserwuje się w przypadku metody Chelpg, natomiast metoda analizy populacyjnej Mullikena charakteryzuje się wspomnianą wcześniej, silną zależnością od rozmiaru bazy funkcyjnej i dopiero w bazie cc-pVQZ osiąga wartość współczynnika korelacji rzędu 0.8.

Analiza błędów przedstawionych w tabeli 3.13, wykazuje, że najmniejszy wpływ na jakość obliczonych wartości CT (w porównaniu z wpływem rozmiaru bazy i modelu ładunków punktowych) ma stosowany poziom teorii (rysunek 3.19). Dla poszczególnych baz funkcyjnych, średnie błędy metod HF, DFT, MP2 i CCD nie różnią się między sobą o więcej niż 5 %.



Rysunek 3.15: Struktura modelowych układów do obliczeń międzycząsteczkowego przeniesienia ładunku.



Rysunek 3.16: Średni błąd względny przeniesienia ładunku w różnych modelach ładunków punktowych obliczony metodą DFT/B3LYP w bazach funkcyjnych cc-pVXZ (X = D, T, Q).

Tabela 3.9: Przeniesienie ładunku w kompleksach typu kwas–zasada Lewisa na poziomie metody Hartree-Focka. Niektórych wartości nie udało się uzyskać ze względu na problemy obliczeniowe, bądź duży koszt obliczeń. Strzałka wskazuje kierunek przepływu ładunku.

Baza funkcyjna	Mulliken	Chelp	Chelpg	NPA	AIM
HCN \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.13 e ¹⁶²			
cc-pVDZ	0.034	0.088	0.076	0.022	—
cc-pVTZ	0.037	0.093	0.084	0.013	—
cc-pVQZ	0.056	0.097	0.088	—	—
CH ₃ CN \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.16 e ¹⁶²			
cc-pVDZ	0.048	0.085	0.086	0.032	—
cc-pVTZ	0.053	0.095	0.097	0.022	—
cc-pVQZ	0.079	0.099	0.102	—	—
H ₃ N \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.36 e ¹⁶¹			
cc-pVDZ	0.258	0.324	0.307	0.223	0.250
cc-pVTZ	0.310	0.333	0.315	0.223	0.229
cc-pVQZ	0.351	0.333	0.316	—	0.230
(CH ₃) ₃ N \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.58 e ¹⁶³			
cc-pVDZ	0.340	0.506	0.464	0.319	—
cc-pVTZ	0.452	0.528	0.474	0.330	—
cc-pVQZ	0.505	0.529	0.482	—	—
H ₃ N \rightarrow BF ₃		CT _{exp} = 0.26 e ¹⁶⁵			
cc-pVDZ	0.406	0.375	0.325	0.256	0.118
cc-pVTZ	0.488	0.348	0.287	0.323	0.086
cc-pVQZ	0.436	0.338	0.274	—	0.089
(CH ₃) ₃ N \rightarrow BF ₃		CT _{exp} = 0.41 e ¹⁶⁵			
cc-pVDZ	0.365	0.472	0.448	0.246	—
cc-pVTZ	0.526	0.451	0.422	0.324	—
cc-pVQZ	0.489	0.440	0.413	—	—

Tabela 3.10: Przeniesienie ładunku w kompleksach typu kwas–zasada Lewisa na poziomie metody DFT (funkcjonał B3LYP). Niektórych wartości nie udało się uzyskać ze względu na problemy obliczeniowe, bądź duży koszt obliczeń. Strzałka wskazuje kierunek przepływu ładunku.

Baza funkcyjna	Mulliken	Chelp	Chelpg	NPA	AIM
HCN \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.13 e ¹⁶²			
cc-pVDZ	0.054	0.099	0.088	0.030	0.057
cc-pVTZ	0.055	0.107	0.098	0.021	0.054
cc-pVQZ	0.072	0.111	0.102	—	0.054
CH ₃ CN \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.16 e ¹⁶²			
cc-pVDZ	0.073	0.119	0.103	0.044	0.077
cc-pVTZ	0.076	0.131	0.114	0.033	0.072
cc-pVQZ	0.102	0.136	0.120	—	0.072
H ₃ N \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.36 e ¹⁶¹			
cc-pVDZ	0.291	0.340	0.321	0.241	0.289
cc-pVTZ	0.320	0.345	0.323	0.241	0.277
cc-pVQZ	0.340	0.345	0.323	—	0.281
(CH ₃) ₃ N \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.58 e ¹⁶³			
cc-pVDZ	0.342	0.453	0.436	0.316	—
cc-pVTZ	0.420	0.482	0.458	0.331	—
cc-pVQZ	0.479	0.490	0.471	—	—
H ₃ N \rightarrow BF ₃		CT _{exp} = 0.26 e ¹⁶⁵			
cc-pVDZ	0.468	0.410	0.361	0.270	0.139
cc-pVTZ	0.464	0.366	0.299	0.338	0.114
cc-pVQZ	0.415	0.355	0.284	—	0.120
(CH ₃) ₃ N \rightarrow BF ₃		CT _{exp} = 0.41 e ¹⁶⁵			
cc-pVDZ	0.422	0.471	0.450	0.248	—
cc-pVTZ	0.487	0.443	0.409	0.332	—
cc-pVQZ	0.482	0.432	0.400	—	—

Tabela 3.11: Przeniesienie ładunku w kompleksach typu kwas–zasada Lewisa na poziomie metody MP2. Niektórych wartości nie udało się uzyskać ze względu na problemy obliczeniowe, bądź duży koszt obliczeń. Strzałka wskazuje kierunek przepływu ładunku.

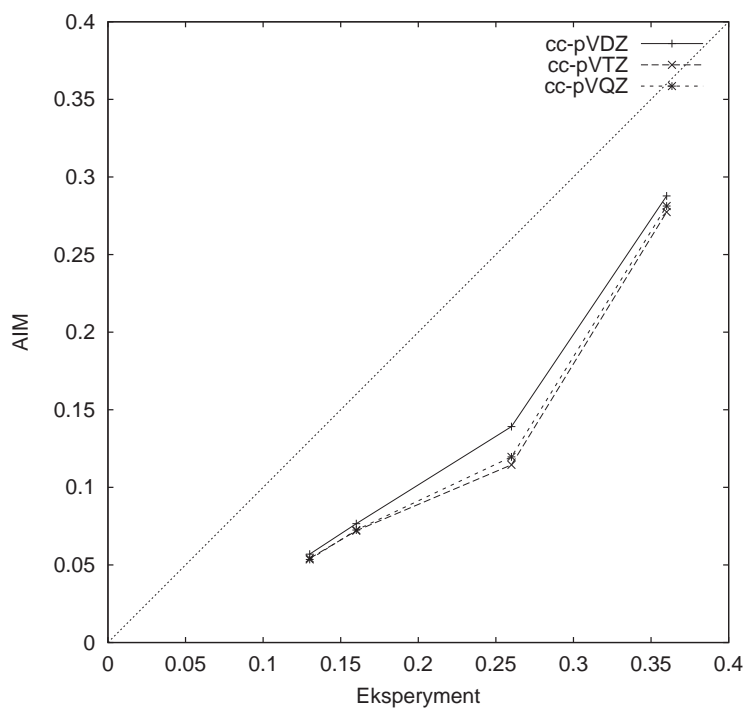
Baza funkcyjna	Mulliken	Chelp	Chelpg	NPA	AIM
	HCN \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.13 e ¹⁶²		
cc-pVDZ	0.041	0.098	0.087	0.026	0.049
cc-pVTZ	0.045	0.103	0.095	0.017	0.047
cc-pVQZ	0.062	0.106	0.100	—	0.046
	CH ₃ CN \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.16 e ¹⁶²		
cc-pVDZ	0.056	—	0.097	0.037	0.065
cc-pVTZ	0.063	—	0.108	0.027	0.062
cc-pVQZ	0.087	—	0.113	—	—
	H ₃ N \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.36 e ¹⁶¹		
cc-pVDZ	0.264	0.330	0.310	0.310	0.226
cc-pVTZ	0.310	0.338	0.317	0.232	0.259
cc-pVQZ	0.345	0.340	0.318	—	0.265
	(CH ₃) ₃ N \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.58 e ¹⁶³		
cc-pVDZ	0.318	0.454	0.434	0.301	—
cc-pVTZ	0.415	0.482	0.458	0.320	—
cc-pVQZ	0.469	—	0.470	—	—
	H ₃ N \rightarrow BF ₃		CT _{exp} = 0.26 e ¹⁶⁵		
cc-pVDZ	0.425	0.396	0.345	0.269	0.133
cc-pVTZ	0.486	0.363	0.297	0.337	0.101
cc-pVQZ	0.445	0.352	0.282	—	0.105
	(CH ₃) ₃ N \rightarrow BF ₃		CT _{exp} = 0.41 e ¹⁶⁵		
cc-pVDZ	0.375	—	0.445	0.251	—
cc-pVTZ	0.512	—	0.414	0.331	—
cc-pVQZ	0.469	—	0.470	—	—

Tabela 3.12: Przeniesienie ładunku w kompleksach typu kwas–zasada Lewisa na poziomie metody sprzężonych klasterów z podwójnymi wzbudzeniami (CCD). Niektórych wartości nie udało się uzyskać ze względu na problemy obliczeniowe, bądź duży koszt obliczeń. Strzałka wskazuje kierunek przepływu ładunku.

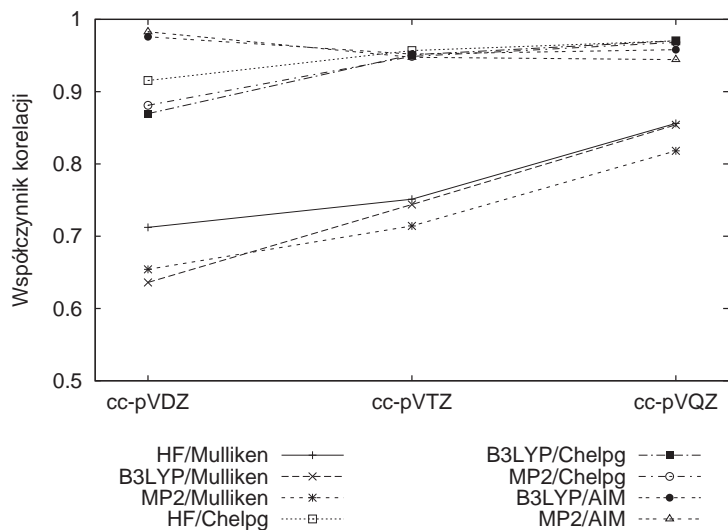
Baza funkcyjna	Mulliken	Chelp	Chelpg	NPA	AIM
HCN \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.13 e ¹⁶²			
cc-pVDZ	0.038	0.083	—	—	—
cc-pVTZ	0.041	0.091	—	—	—
H ₃ N \rightarrow SO ₃		CT _{exp} = 0.36 e ¹⁶¹			
cc-pVDZ	0.263	0.309	—	—	—
cc-pVTZ	0.314	0.317	—	—	—
H ₃ N \rightarrow BF ₃		CT _{exp} = 0.26 e ¹⁶⁵			
cc-pVDZ	0.425	0.342	0.273	0.135	—
cc-pVTZ	0.492	0.296	0.339	0.101	—

Tabela 3.13: Średni błąd względny przeniesienia ładunku obliczony dla teoretycznych wartości CT względem wyników eksperymentalnych (w procentach). Bazy funkcyjne oznaczono w następujący sposób: D = cc-pVDZ, T = cc-pVTZ, Q = cc-pVQZ.

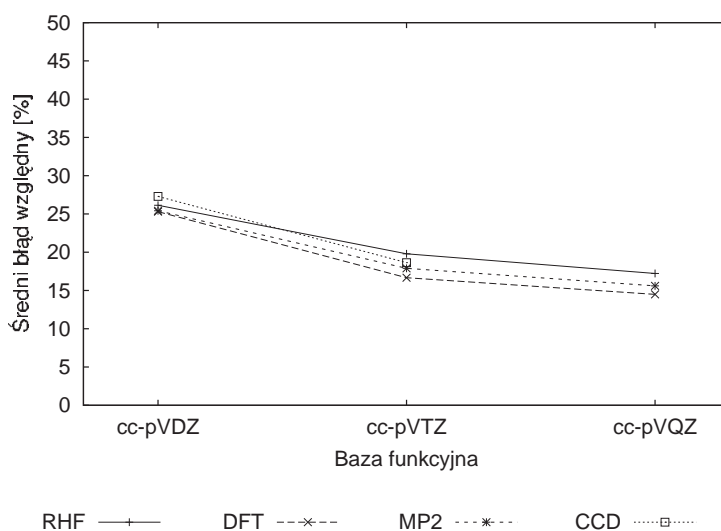
Metoda	RHF			B3LYP		
	D	T	Q	D	T	Q
Mulliken	46.8	48.3	35.1	42.7	41.0	30.2
Chelpg	26.1	19.8	17.2	25.3	16.7	14.5
Chelp	26.9	21.5	19.5	24.9	17.6	15.2
NPA	47.9	50.4	—	45.2	48.0	—
AIM	42.4	51.8	51.0	43.7	48.1	47.3
	MP2			CCD		
Mulliken	46.1	46.7	35.1	53.7	56.9	—
Chelpg	25.4	17.9	15.6	27.3	18.6	—
Chelp	26.9	20.8	19.8	—	—	—
NPA	47.4	49.9	—	—	—	—
AIM	49.2	53.6	50.2	—	—	—



Rysunek 3.17: Porównanie wartości CT wyznaczonych metodą AIM na poziomie metody DFT/B3LYP dla kompleksów $\text{HCN}\cdot\text{SO}_3$, $\text{CH}_3\text{CN}\cdot\text{SO}_3$, $\text{H}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, $\text{H}_3\text{N}\cdot\text{BF}_3$, z wartościami eksperymentalnymi.



Rysunek 3.18: Współczynnik korelacji pomiędzy eksperymentalnymi i teoretycznymi wartościami CT dla różnych poziomów teorii i modeli ładunków punktowych.



Rysunek 3.19: Średni błąd względny przeniesienia ładunku obliczonego w modelu Chelpg na różnych poziomach teorii w bazach funkcyjnych cc-pVXZ (X = D, T, Q).

Fiacco i współpracownicy zaobserwowali¹⁶⁵ w przypadku kompleksów $\text{H}_3\text{N}\cdot\text{BF}_3$ i $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{BF}_3$ znaczne, jakościowe rozbieżności pomiędzy wartościami CT obliczonymi przy użyciu analizy populacyjnej Mullikena oraz metody NPA, a wynikami eksperymentalnymi. Jak pokazują tabele 3.9, 3.10 i 3.11, zastosowanie metody Chelpg na dowolnym poziomie teorii już w małej bazie funkcyjnej (cc-pVDZ) daje jakościowo poprawny wynik, natomiast użycie dużej bazy, pozwala oszacować ten wynik z dokładnością do kilku procent.

Interesujące może być również znalezienie prostej relacji opisującej wpływ przeniesienia ładunku na składową CT energii oddziaływania (ΔE_{CT}). Taką próbę podjęli w swojej pracy Mo i Gao,¹⁷¹ odnotowując dla grupy kompleksów typu kwas–zasada Lewisa liniową zależność wielkości przeniesionego ładunku i składowej energii oddziaływania typu CT. Zależność ta, została zaobserwowana w oparciu o ładunki punktowe Mullikena i NPA oraz składową energię oddziaływania ΔE_{CT} , a współczynnik korelacji wynosił 0.935 dla metody Mullikena i 0.992 dla metody NPA. Biorąc pod uwagę przedstawione powyżej wyniki, a w szczególności dużą rozbieżność w przypadku metody Mullikena, zbadano zależność eksperymentalnych wartości CT od składowych energii oddziaływania obliczonych według schematu wariacyjno–perturbacyjnego przedstawionego w rozdziale 2.3, a także ponownie porównano je ze składową CT i całkowitą energią oddziaływania obliczonymi przez Mo i Gao¹⁷¹ bez eliminacji niefizycznego błędu superpozycji bazy funkcyjnej. Należy dodać, że składowe energie oddziaływania uzyska-

ne w stosowanym w niniejszej pracy schemacie wariacyjno-perturbacyjnym nie są obarczone tym błędem. W odniesieniu do wartości eksperymentalnych współczynnik korelacji ze składową CT jest niższy (0.90). Ponadto, jak pokazują wyniki dla kompleksu $\text{H}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, zastosowana baza funkcyjna (6-31+G(d,p)) nie jest wystarczająca, gdyż energia oddziaływania na poziomie MP2 (-19.7 kcal/mol) różni się znacznie od wartości obliczonej w bazie cc-pVQZ (-25.3 kcal/mol), a spośród składowych energii oddziaływań, składowa CT jest szczególnie wrażliwa na rozmiar bazy funkcyjnej.¹³¹ Dlatego można podejrzewać, że zaobserwowana liniowa korelacja jest przypadkowa.

Spośród składowych obliczonych w rachunku wariacyjno-perturbacyjnym, tylko składowa Heitlera-Londona wykazuje duży współczynnik korelacji, jednak również w tym przypadku można spodziewać się przypadkowej zgodności, jako że składowa ta jest obliczana na podstawie niezaburzonej funkcji falowej i nie może uwzględniać delokalizacji gęstości elektronowej. W ogólności, trudno się spodziewać liniowej zależności pomiędzy ilością przeniesionego ładunku, a jakąkolwiek składową energii oddziaływania, gdyż na przykład w symetrycznych kompleksach przeniesienie ładunku wynosi dokładnie zero, natomiast składowe energii oddziaływania zerowe nie są.

Tabela 3.14: Składowe energii oddziaływania międzycząsteczkowego w kompleksach typu kwas-zasada Lewisa (w kcal/mol). W kolumnie BF podano symbole baz funkcyjnych stosowanych w schemacie dekompozycji Sokalskiego i Roszaka (kolumny od $\Delta E_{el}^{(1)}$ do ΔE^{MP2}); są to: D = cc-pVDZ, T = cc-pVTZ, Q = cc-pVQZ. Kolumny BLW_{CT} oraz BLW oznaczają odpowiednio energię oddziaływania CT i całkowitą, obliczone przez Mo i Gao¹⁷¹ metodą *Block-localized Wavefunction* w bazie 6-311+G(d,p).

Kompleks	CT _{exp}	BF	$\Delta E_{el}^{(1)}$	$\Delta E_{ex}^{(1)}$	ΔE_{HL}	$\Delta E_{del}^{(R)}$	ΔE^{SCF}	ΔE_{corr}	ΔE^{MP2}	BLW _{CT}	BLW
HCN – SO ₃	0.13	D	-14.55	15.38	0.83	-5.48	-4.65	0.24	-4.41	-1.9	-6.8
		T	-13.53	15.09	1.56	-6.23	-4.68	-1.82	-6.50		
NH ₃ – SO ₃	0.36	D	-82.59	113.78	31.19	-53.49	-22.30	8.93	-13.37	-53.3	-19.7
		T	-77.92	110.72	32.80	-58.54	-25.74	3.62	-22.12		
		Q	-77.12	109.93	32.81	-59.64	-26.83	1.50	-25.33		
(CH ₃) ₃ N – SO ₃	0.58	D	-116.42	174.87	58.45	-95.66	-37.20	10.06	-27.15	-65.0	-33.2
NH ₃ – BF ₃	0.26	D	-105.04	128.40	23.37	-68.77	-45.40	7.11	-38.28	-36.1	-21.8
		T	-96.58	121.74	25.16	-71.19	-46.03	2.12	-43.91		
(CH ₃) ₃ N – BF ₃	0.41	D	-112.61	137.59	24.98	-80.71	-55.73	5.99	-49.74	-37.3	-30.4
Wsp. korelacji		D	0.80	0.89	0.95	0.88	0.54	0.83	0.42	0.90	0.92

Rozdział 4

Podsumowanie

Praca dotyczy trzech zagadnień związanych z badaniem aktywności katalitycznej enzymów oraz oddziaływań w kompleksach enzymu z ligandami (substratem, stanem przejściowym, inhibitorem, ...). Metody badania funkcji katalitycznych enzymów — metodę DTSS oraz metody pól katalitycznych wykorzystano do zbadania źródeł aktywności katalitycznej mutazy choryzmianowej.

- Na podstawie tych badań określono wkłady poszczególnych reszt znajdujących się w centrum aktywnym do całkowitego obniżenia bariery aktywacji (rozdział 3.1) i stwierdzono, że można je uszeregować następująco: Arg90 > Arg7 > Glu78 > XSOL124 > Arg116 > Arg63 > Cys75 > SOLV7102 > XSOL116 > Tyr108 > Val73 > Phe57 > Lys60.
- Największy wkład do obniżenia bariery aktywacji (około 1/3 całkowitej wartości) wnosi arginina Arg90. Wyniki te zgadzają się z rezultatami eksperymentów mutagenyzy oraz innymi pracami teoretycznymi polegającymi na symulacjach reakcji (głównie metodą QM/MM) na różnych poziomach teorii.
- Wkład do obniżenia bariery aktywacji, wykazuje również ujemnie naładowany glutaminian Glu78, pomimo, że jego energia oddziaływania z substratem i TS jest dodatnia. Przyczyną obniżania bariery przez Glu78 jest względna destabilizacja substratu.
- W centrum aktywnym przeważają oddziaływania o charakterze elektrostatycznym, a składowe energii oddziaływania wyższych rzędów (korelacyjnej, delokalizacyjnej, wymiennej i penetracyjnej) kasują się, co pozwala uzyskać poprawny jakościowo opis wkładów do obniżenia bariery aktywacji, już na poziomie oddziaływań elektrostatycznych ($\Delta E_{el}^{(1)}$, $\Delta_{el}^{(1)}$) oraz na poziomie rozwinięcia

multipolowego ($\Delta E_{el.mtp}^{(1)}$, $\Delta_{el.mtp}^{(1)}$). W porównaniu z poziomem metody MP2, obniżenie bariery aktywacji obliczone bez oddziaływań o charakterze korelacyjnym (metoda HF) jest zawyżone, ale wykazuje bardzo wysoki współczynnik korelacji (0.98), co oznacza jednakową wartość oddziaływań korelacyjnych w przypadku wszystkich badanych reszt. Dobrą zgodność i wysoki współczynnik korelacji (odpowiednio 0.92 i 0.85) otrzymuje się na wspomnianym poziomie oddziaływań elektrostatycznych i multipolowych.

- **Wyniki te pozwalają na wskazanie niskim kosztem obliczeniowym reszt odgrywających najważniejszą rolę w aktywności katalitycznej enzymu.**
- **Dla reakcji zachodzącej w centrum aktywnym CM zaprojektowano statyczne pole katalityczne, co było możliwe dzięki przeważającemu udziałowi oddziaływań elektrostatycznych.**
- **W wyniku porównania otrzymanego pola katalitycznego z konfiguracją reszt w centrum aktywnym, stwierdzono zgodność ładunków formalnych reszt (głównie dodatnio naładowanych arginin i ujemnie naładowanego glutaminianu) z polem katalitycznym.** Położenie zgodne z przewidywaniami pola katalitycznego wykazują nie tylko reszty z centrum aktywnego CM z *B. subtilis* (które było używane w obliczeniach QM/MM do przygotowania struktury) ale również reszty z centrów aktywnych mutaz z *E. coli* i *S. cerevisiae*. Centra te zawierają konserwatywne reszty, do których należą właśnie wspomniane arginy oraz glutaminian. Powyższe spostrzeżenia sugerują, że ewolucja trzech mutaz przebiegała w taki sposób, aby zachować zgodność rozkładu ładunku w centrum aktywnym z polem katalitycznym reakcji, a jednocześnie pokazują, że enzymy te osiągnęły strukturę optymalną ze względu na katalizowaną reakcję. Faktycznie, w przypadku mutazy choryzmianowej współczynnik k_{cat}/K_m jest tak wysoki, że uważa się iż czynnikiem limitującym w przypadku CM jest dyfuzja substratów i produktów.⁹
- **Obliczając całkowite obniżenie bariery aktywacji względem fazy gazowej, które wynosi około -23 kcal/mol, wykazano, że efekt DTSS nie może być zaniedbany.** Zarówno w obliczeniach DTSS, jak i w obliczeniach pól katalitycznych zastosowano strukturę substratu zadokowaną w centrum aktywnym CM, zgodną z definicją NAC. W takim wypadku — gdyby efekt NAC był dominujący — obliczona wartość Δ powinna być niewielka. Ponadto, statyczne pole katalityczne obliczone dla struktury TS i NAC (substratu) wykazuje istotne zmiany w rozkładzie ładunku, zachodzące pomiędzy tymi strukturami. Oznacza to, że pomiędzy NAC, a TS geometria nie zmienia się

w istotny sposób, natomiast zrywanie i tworzenie wiązań prowadzi do znacznych zmian w strukturze elektronowej, których teoria NAC nie uwzględnia.

- **Wewnętrzne dynamiczne pole katalityczne obliczone dla reakcji przegrupowania choryzmianu do preferianu, przewiduje dodatkowe obniżenie bariery aktywacji związane z ruchem otoczenia w trakcie reakcji.** Analiza tego pola w kontekście reszt znajdujących się w centrum aktywnym CM prowadzi do wniosku, że naładowane reszty (argininy i glutaminian) powinny oddalać się od reagującego układu przy przejściu od substratu do TS.
- **W przypadku glutaminianu Glu78 i argininy Arg90 efekt ten sprawdzono obliczając wartość Δ dla różnych konformerów i otrzymano zgodne wyniki.**
- **Dodatkowo, analiza wpływu konformacji grupy hydroksylowej choryzmianu/TS na obniżenie bariery aktywacji wykazuje, że grupa ta powinna obracać się w czasie reakcji, co może znacznie obniżyć barierę.**

Zagadnieniem pokrewnym do katalizy jest inhibicja, zbadana w niniejszej pracy na przykładzie kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego oraz amoniakolizy fenyloalaninowej. Inhibitor AIP może przyjmować dwie konformacje (aksjalną, AC oraz ekwatorialną, EC), a także sześć stanów protonacji grup funkcyjnych.

- **W obliczeniach *ab initio* zbadano stabilność i względną energię form w fazie gazowej, w wyniku czego stwierdzono, że formą stabilniejszą — bez względu na stan protonacji — jest forma ekwatorialna.** Forma AC ma nieco wyższą energię i oddziela ją od formy EC niewielka bariera. Otrzymane wyniki są częściowo zgodne z rezultatami badań NMR dla AIP w roztworze. W wyniku tych badań stwierdzono, że w środowisku zasadowym istnieje tylko forma EC, natomiast przy przejściu do środowiska kwaśnego równowaga przesuwa się na korzyść formy AC.
- **Dokowanie AIP programem AutoDock do centrum aktywnego PAL uzyskanego metodą modelowania przez homologię wykazało, iż tylko forma AC, i to bez względu na stan protonacji grup funkcyjnych, jest wiązana specyficjnie w centrum aktywnym.**
- **Oznacza to, że inhibitor przed związaniem musi zmienić konformację z EC na AC, bądź enzym wiąże tylko te cząsteczki inhibitora, które już znajdują się w konformacji AC.** Ten fakt

mógłby wyjaśniać, dlaczego w przypadku AIP obserwuje się znacznie wolniejszy proces inhibicji, niż w przypadku innych inhibitorów.

Ze względu na istotną rolę, jaką pełni zjawisko przeniesienia ładunku w układach enzymatycznych, w niniejszej pracy wykonano szereg testów sprawdzających różne metody wyznaczania ładunków punktowych, stosowane do obliczania międzycząsteczkowego przeniesienia ładunku. Wyniki teoretyczne porównano z wartościami eksperymentalnymi dostępnymi w literaturze dla małych kompleksów typu kwas–zasada Lewisa.

- **Na podstawie tej analizy potwierdzono wielokrotnie obserwowaną silną zależność ładunków Mullikena od wielkości bazy funkcyjnej.**
- **Stwierdzono, że dużo mniejszą zależność wykazują metody oparte na odtwarzaniu potencjału elektrostatycznego lub wyznaczaniu ładunków metodą AIM Badera.**
- **Spośród wszystkich przebadanych metod, procedury oparte na aproksymacji wartości potencjałów elektrostatycznych wykazały najmniejszy błąd względny.** Analizy populacyjne i AIM wykazały duży błąd względny w stosunku do wartości eksperymentalnych CT, sięgający nawet 50%, podczas gdy w przypadku metody Chelpg nie przekracza on 27% w najmniejszej bazie funkcyjnej cc-pVDZ. Wysoki współczynnik korelacji w przypadku metod AIM i Chelpg wskazuje na systematyczny charakter błędów, co w przypadku jakościowej analizy czyni te metody jeszcze bardziej wiarygodnymi. Metoda Chelpg charakteryzuje się niskim kosztem obliczeniowym, dlatego z powodzeniem może być stosowana w dużych układach, jakimi są centra aktywne enzymów.
- **Ponadto, porównanie kilku poziomów teorii (RHF, DFT, MP2, CCD) wykazało, że uwzględnienie efektów korelacyjnych, poprzez wybór odpowiedniej metody nie poprawia otrzymanych wartości CT w tak istotny sposób jak dobór odpowiedniej metody wyznaczania ładunków punktowych.**

Przedstawione w niniejszej pracy metody — od dokowania inhibitorów, substratów, czy stanów przejściowych, po pola katalityczne — mogą być zastosowane w projektowaniu nowych lub modyfikacji istniejących katalizatorów. Mogą być one użyte nie tylko do projektowania enzymów, ale również nieorganicznych katalizatorów, takich jak zeolity, czy tak zwane *imprinty* molekularne w matrycy krzemionkowej. Wszystkie badane metody, są stosunkowo proste, co pozwala na szybkie przeanalizowanie szeregu układów i wybór najbardziej obiecujących do dalszych badań metodami eksperymentalnymi, bądź też bardziej zaawansowanymi metodami teoretycznymi.

Spis publikacji i wystąpień konferencyjnych

Lista publikacji

1. **B. Szefczyk**, W. A. Sokalski, J. Leszczynski, *Optimal methods for calculation of the amount of intermolecular electron transfer*, **J. Chem. Phys.**, *117*, 6952—6958 (2002)
2. K. E. Ranaghan, L. Ridder, **B. Szefczyk**, W. A. Sokalski, J. C. Hermann, A. J. Mulholland, *Insights into enzyme catalysis from QM/MM modelling: transition state stabilization in chorismate mutase*, **Mol. Phys.**, *101*, 2695—2714 (2003)
3. K. E. Ranaghan, L. Ridder, **B. Szefczyk**, W. A. Sokalski, J. C. Hermann, A. J. Mulholland, *Transition state stabilization and substrate strain in enzyme catalysis: ab initio QM/MM modelling of the chorismate mutase reaction*, **Org. Biomol. Chem.**, *2*, 968—980 (2004)
4. E. Dyguda, **B. Szefczyk**, W. A. Sokalski, *The mechanism of phosphoryl transfer reaction and the role of active site residues on the basis of ribokinase-like kinases*, **Int. J. Mol. Sci.**, *5*, 141—153 (2004)
5. J. Zoń, **B. Szefczyk**, W. Sawka-Dobrowolska, R. Gancarz, M. Kucharska-Zoń, R. Latajka, N. Amrhein, P. Miziak, W. Szczepanik, *Experimental and ab initio calculated structures of 2-aminoindane-2-phosphonic acid, a potent inhibitor of phenylalanine ammonia-lyase, and theoretical studies of its binding to the model enzyme structure of the chorismate mutase reaction*, **New J. Chem.**, *28*, 1048—1055 (2004)
6. **B. Szefczyk**, A. J. Mulholland, K. E. Ranaghan, W. A. Sokalski, *Differential Transition State Stabilization in Enzyme Catalysis: Quantum Chemical Analysis of Interactions in the Chorismate Mutase Reaction and Prediction of the Optimal Catalytic Field*, **J. Am. Chem. Soc.**, *126*, 16148—16159 (2004)

7. A. Kluczyk, **B. Szefczyk**, N. Amrhein, J. Zoń, *The Influence of (E)-Cinnamic Acid Analogues on Phenylalanine Ammonia-Lyase and Anthocyanin Biosynthesis*, *Pol. J. Chem.*, **79**, 583—592 (2005)
8. P. Wielgus, R. W. Góra, **B. Szefczyk**, S. Roszak, *The Influence of the Argon Solvation on the Electron Affinity Properties of the Water Dimer Anion*, w przygotowaniu

Lista wystąpień konferencyjnych

1. **B. Szefczyk**, R. Gancarz, poster P71, *Conformational analysis in drug design*, 5th International Conference: Computers in Chemistry '99, Szklarska Poręba, Polska, 1999.
2. W. A. Sokalski, P. Kędzierski, J. Grembecka, **B. Szefczyk**, poster I-22, *Exploring the physical nature of inhibitory and catalytic activity of enzymes*, 3rd European Conference on Computational Chemistry, Budapeszt, Węgry, 2000.
3. W. A. Sokalski, J. Grembecka, P. Kędzierski, P. Dziekoński, **B. Szefczyk**, poster M5 W3, *Physical nature of Inhibitory and Catalytic activity of Enzymes*, Zjazd PTChem, Łódź, Polska, 2000.
4. W. A. Sokalski, P. Dziekoński, **B. Szefczyk**, P. Kędzierski, poster, *Analysis of intermolecular interactions and charge transfer in molecular aggregates*, XXII EuroSummerSchool, Erice, Włochy, 2001.
5. **B. Szefczyk**, W. A. Sokalski, poster P-13, *Optimal methods for calculation of intermolecular charge transfer*, The 1st Summer School on Parallel Computing in Biomolecular Simulations, Gdańsk, Polska, 2001.
6. **B. Szefczyk**, W. A. Sokalski, *Optimal methods for calculation of intermolecular charge transfer*, Austrian – Czech – Polish – Slovak Symposium on Quantum Chemistry, Ustroń-Jaszowiec, Polska, 2001.
7. W. A. Sokalski, P. Dziekoński, P. Kędzierski, **B. Szefczyk**, Y. Podolyan, J. Leszczynski, *Use of Differential Transition State Stabilisation Approach in Analysis of Catalytic Effects and Catalyst Design*, Second Southern School on Computational Chemistry, Orange Beach, Alabama, USA, 2002.
8. W. A. Sokalski, P. Kędzierski, **B. Szefczyk**, J. Cwalińska, Y. Podolyan, J. Leszczynski, *Quantum Chemical Analysis of Catalytic Effects and Catalyst Design within Differential Transition State Stabilisation (DTSS) Approach*, Spring Symposium and Collaborative Workshop

in Biomedical Research Among RCMI Centers, Jackson, Mississippi, USA, 2002.

9. W. A. Sokalski, P. Dziekoński, P. Kędzierski, **B. Szefczyk**, J. Grembecka, J. Leszczyński, *Analysis of Catalytic and Inhibitory Effects and its Use in Catalyst and Inhibitor Design*, Modelling Interactions in Biomolecules, Nove Hradý, Czechy, 15–20 IX 2003.
10. E. Dyguda, **B. Szefczyk**, W. A. Sokalski, *Insights Into Mechanism of Phosphoryl Transfer Reaction and the Role of Active Site Residues on the Basis of Ribokinase-like Kinases*, Modelling Interactions in Biomolecules, Nove Hradý, Czechy, 15–20 IX 2003.
11. **B. Szefczyk**, J. Zoń, *Binding of 2-aminoindan-2-phosphonic acid, a New Phenylalanine Ammonia-Lyase Inhibitor to the Model of Enzyme Active Site*, Modelling Interactions in Biomolecules, Nove Hradý, Czechy, 15–20 IX 2003.
12. **B. Szefczyk**, W. A. Sokalski, K. Ranaghan, A. J. Mulholland, *Analysis of the Physical Nature of Catalytic Effects in the Chorismate Mutase and the Prediction of the General Characteristics of the Optimal Static and Dynamic Catalytic Fields*, Modelling Interactions in Biomolecules, Nove Hradý, Czechy, 15–20 IX 2003.
13. **B. Szefczyk**, A. J. Mulholland, K. Ranaghan, W. A. Sokalski, *Transition state stabilization in chorismate mutase — activation barrier lowering by substrate and residue motions*, ISQBP President's Meeting, Como, Włochy, 5-8 VI 2004.
14. **B. Szefczyk**, E. Dyguda, W. A. Sokalski, *Static and dynamic catalytic fields and differential transition state stabilization — applications to enzymatic catalysis*, WATOC Conference, Kapsztad, RPA, 16-21 I 2005.

Bibliografia

- [1] W. Kaminsky, A. Laban. *Metallocene catalysis*. Appl. Catal. A – Gen., **222** (2001) 47–61.
- [2] O. Kirk, T. V. Borchert, C. C. Fuglsang. *Industrial enzyme applications*. Curr. Op. Biotechnol., **13** (2002) 345–351.
- [3] A. Yarnell. *The Power of Promiscuity*. Chem. Eng. News, **81** (2003) 33–35.
- [4] L. Pauling. *Molecular architecture and biological reactions*. Chem. Eng. News, **24** (1946) 1375–1377.
- [5] P. K. Agarwal, S. R. Billeter, P. T. R. Rajagopalan, S. J. Benkovic, S. Hammes-Schiffer. *Network of coupled promoting motions in enzyme catalysis*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **99** (2002) 2794–2799.
- [6] J. B. Watney, P. K. Agarwal, S. Hammes-Schiffer. *Effect of Mutation on Enzyme Motion in Dihydrofolate Reductase*. J. Am. Chem. Soc., **125** (2003) 3745–3750.
- [7] S. Piana, P. Carloni, M. Parrinello. *Role of Conformational Fluctuations in the Enzymatic Reaction of HIV-1 Protease*. J. Mol. Biol., **319** (2002) 567–583.
- [8] A. S. Bommarius, B. Riebel. *Biocatalysis* (WILEY-VCH, Weinheim, Germany, 2004).
- [9] M. G. Snider, B. S. Temple, R. Wolfenden. *The path to the transition state in enzyme reactions: a survey of catalytic efficiencies*. J. Phys. Org. Chem., **17** (2004) 586–591.
- [10] R. Wolfenden, M. J. Snider. *The Depth of Chemical Time and Power of Enzymes as Catalysts*. Acc. Chem. Res., **34** (2001) 938–945.
- [11] M. A. Dwyer, L. L. Looger, H. W. Hellinga. *Computational Design of a Biologically Active Enzyme*. Science, **304** (2004) 1967–1971.

- [12] N. G. Ternan, J. W. M. Grath, G. M. Mullan, J. P. Quinn. *Review: Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms*. World J. Microbiol. & Biotech., **14** (1998) 635–647.
- [13] F. M. Raushel. *Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents*. Curr. Op. Microbiol., **5** (2002) 288–295.
- [14] C. M. Hill, W.-S. Li, J. B. Thoden, H. M. Holden, F. M. Raushel. *Enhanced Degradation of Chemical Warfare Agents through Molecular Engineering of the Phosphotriesterase Active Site*. J. Am. Chem. Soc., **125** (2003) 8990–8991.
- [15] B. E. Lewis, V. L. Schramm. *Glucose Binding Isotope Effects in the Ternary Complex of Brain Hexokinase Demonstrate Partial Relief of Ground-State Destabilization*. J. Am. Chem. Soc., **125** (2003) 4672–4673.
- [16] R. C. Noonan, C. W. Carter, Jr., C. K. Bagdassarian. *Enzymatic conformational fluctuations along the reaction coordinate of cytidine deaminase*. Prot. Sci., **11** (2002) 1424–1434.
- [17] M. J. Sutcliffe, N. S. Scrutton. *A new conceptual framework for enzyme catalysis. Hydrogen tunneling coupled to enzyme dynamics in flavoprotein and quinoprotein enzymes*. Eur. J. Biochem., **269** (2002) 3096–3102.
- [18] A. Tousignant, J. N. Pelletier. *Protein Motions Promote Catalysis*. Chemistry & Biology, **11** (2004) 1037–1042.
- [19] C. Alhambra, J. Corchado, M. L. Sánchez, M. Garcia-Viloca, J. Gao, D. G. Truhlar. *Canonical Variational Theory for Enzyme Kinetics with the Protein Mean Force and Multidimensional Quantum Mechanical Tunneling Dynamics. Theory and Application to Liver Alcohol Dehydrogenase*. J. Phys. Chem. B, **105** (2001) 11326–11340.
- [20] D. G. Truhlar, J. Gao, C. Alhambra, M. Garcia-Viloca, J. Corchado, M. L. Sánchez, J. Villà. *The Incorporation of Quantum Effects in Enzyme Kinetics Modeling*. Acc. Chem. Res., **35** (2002) 341–349.
- [21] M. Garcia-Viloca, J. Gao, M. Karplus, D. G. Truhlar. *How Enzymes Work: Analysis by Modern Rate Theory and Computer Simulations*. Science, **303** (2004) 186–195.
- [22] C. J. Cramer. *Essentials of Computational Chemistry. Theories and Models* (John Wiley & Sons Ltd, USA, 2002).
- [23] P. K. Agarwal, S. R. Billeter, S. Hammes-Schiffer. *Nuclear Quantum Effects and Enzyme Dynamics in Dihydrofolate Reductase Catalysis*. J. Phys. Chem. B, **106** (2002) 3283–3293.

- [24] S. Hammes-Schiffer. *Impact of Enzyme Motion on Activity*. *Biochemistry*, **41** (2002) 13335–13343.
- [25] J. B. S. Haldane. *Enzymes* (Longman, Green & Co., London, 1930).
- [26] J. B. S. Haldane. *Enzymes* (M.I.T. Press, Cambridge/MA, USA, 1965).
- [27] B. Szeferczyk, A. J. Mulholland, K. E. Ranaghan, W. A. Sokalski. *Differential Transition State Stabilization in Enzyme Catalysis: Quantum Chemical Analysis of Interactions in the Chorismate Mutase Reaction and Prediction of the Optimal Catalytic Field*. *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (2004) 16148–16159.
- [28] M. Štrajbl, A. Shurki, M. Kato, A. Warshel. *Apparent NAC Effect in Chorismate Mutase Reflects Electrostatic Transition State Stabilization*. *J. Am. Chem. Soc.*, **125** (2003) 10228–10237.
- [29] J. Villà, A. Warshel. *Energetics and Dynamics of Enzymatic Reactions*. *J. Phys. Chem. B*, **105** (2001) 7887–7907.
- [30] A. Shurki, M. Štrajbl, J. Villà, A. Warshel. *How Much Do Enzymes Really Gain by Restraining Their Reacting Fragments?*. *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (2002) 4097–4107.
- [31] P. D. Lyne, A. J. Mulholland, W. G. Richards. *Insights into chorismate mutase catalysis from a combined QM/MM simulation of the enzyme reaction*. *J. Am. Chem. Soc.*, **117** (1995) 11345–11350.
- [32] D. E. Koshland Jr. *Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **44** (1958) 98–104.
- [33] D. E. Koshland Jr., G. Neméthy, D. Filmer. *Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits*. *Biochemistry*, **5** (1966) 365–385.
- [34] S. Martí, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, J. Bertrán. *A Comparative Study of Claisen and Cope Rearrangements Catalyzed by Chorismate Mutase. An Insight into Enzymatic Efficiency: Transition State Stabilization or Substrate Preorganization?*. *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (2004) 311–319.
- [35] S. Hur, T. C. Bruice. *The mechanism of catalysis of the chorismate to prephenate reaction by the Escherichia coli mutase enzyme*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **99** (2002) 1176–1181.
- [36] S. Hur, T. C. Bruice. *The near attack conformation approach to the study of the chorismate to prephenate reaction*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **100** (2003) 12015–12020.

- [37] C. R. W. Guimarães, M. P. Repasky, J. Chandrasekhar, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen. *Contributions of Conformational Compression and Preferential Transition State Stabilization to the Rate Enhancement by Chorismate Mutase*. J. Am. Chem. Soc., **125** (2003) 6892–6899.
- [38] S. Hur, T. C. Bruice. *Enzymes Do What Is Expected (Chalcone Isomerase versus Chorismate Mutase)*. J. Am. Chem. Soc., **125** (2003) 1472–1473.
- [39] S. Hur, T. C. Bruice. *Comparison of Formation of Reactive Conformers (NACs) for the Claisen Rearrangement of Chorismate to Prephenate in Water and in the E. coli Mutase: The Efficiency of the Enzyme Catalysis*. J. Am. Chem. Soc., **125** (2003) 5964–5972.
- [40] K. E. Ranaghan, A. J. Mulholland. *Conformational effects in enzyme catalysis: QM/MM free energy calculation of the ‘NAC’ contribution in chorismate mutase*. Chem. Commun., 1238–1239.
- [41] A. Shurki, A. Warshel. *Structure/function correlations of proteins using MM, QM/MM, and related approaches: Methods, concepts, pitfalls, and current progress*. Adv. Prot. Chem., **66** (2003) 249–313.
- [42] S. D. Schwartz. *Response to Comment on “Effect of active site mutation Phe 93 → Trp in the horse liver alcohol dehydrogenase enzyme on catalysis: A molecular dynamics study”*. J. Phys. Chem. B, **107** (2003) 12372.
- [43] Q. Cui, M. Karplus. *Promoting Modes and Demoting Modes in Enzyme-Catalyzed Proton Transfer Reactions: A Study of Models and Realistic Systems*. J. Phys. Chem. B, **106** (2002) 7927–7947.
- [44] G. S. B. Williams, A. M. Hossain, D. E. Kranbuehl, C. K. Bagdassarian. *Evolution of Rate-Promoting Oscillations in a Model Enzyme*. J. Phys. Chem. B, **107** (2003) 12527–12533.
- [45] H. Chojnacki, J. Lipiński, W. A. Sokalski. *Potential Energy Curves in Complementary Base Pairs and in Model Hydrogen Bonded Systems*. Int. J. Quant. Chem., **19** (1981) 339–346.
- [46] K. F. Wong, J. B. Watney, S. Hammes-Schiffer. *Analysis of Electrostatics and Correlated Motions for Hydride Transfer in Dihydrofolate Reductase*. J. Phys. Chem. B, **108** (2004) 12231–12241.
- [47] C. Kalyanaraman, S. D. Schwartz. *Effect of active site mutation Phe 93 → Trp in the horse liver alcohol dehydrogenase enzyme on catalysis: A molecular dynamics study*. J. Phys. Chem. B, **106** (2002) 13111–13113.

- [48] A. Warshel, J. Villà-Freixa. *Comment on “Effect of active site mutation Phe 93 → Trp in the horse liver alcohol dehydrogenase enzyme on catalysis: A molecular dynamics study”*. J. Phys. Chem. B, **107** (2003) 12370–12371.
- [49] M. T. Reetz, K. E. Jaeger. *Superior biocatalysts by directed evolution*. Biocatalysis - From Discovery to Application, numer 200 w Topics in Current Chemistry, 31–57 (1999).
- [50] P. Kast, J. D. Hartgerink, M. Asif-Ullah, D. Hilvert. *Electrostatic Catalysis of the Claisen Rearrangement: Probing the Role of Glu78 in Bacillus subtilis Chorismate Mutase by Genetic Selection*. J. Am. Chem. Soc., **118** (1996) 3069–3070.
- [51] P. Kast, M. Asif-Ullah, N. Jiang, D. Hilvert. *Exploring the active site of chorismate mutase by combinatorial mutagenesis and selection: The importance of electrostatic catalysis*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **93** (1996) 5043–5048.
- [52] D. R. Liu, S. T. Cload, R. M. Pastor, P. G. Schultz. *Analysis of Active Site Residues in Escherichia coli Chorismate Mutase by Site-Directed Mutagenesis*. J. Am. Chem. Soc., **118** (1996) 1789–1790.
- [53] S. T. Cload, D. R. Liu, R. M. Pastor, P. G. Schultz. *Mutagenesis Study of Active Site Residues in Chorismate Mutase from Bacillus subtilis*. J. Am. Chem. Soc., **118** (1996) 1787–1788.
- [54] A. Peracchi. *Enzyme catalysis: removing chemically ‘essential’ residues by site-directed mutagenesis*. Trends Biochem. Sci., **26** (2001) 497–503.
- [55] P. J. Berti, V. L. Schramm. *Transition State Structure of the Solvolytic Hydrolysis of NAD⁺*. J. Am. Chem. Soc., **119** (1997) 12069–12078.
- [56] V. L. Schramm. *Enzymatic transition states: thermodynamics, dynamics and analogue design*. Arch. Biochem. Biophys., **433** (2005) 13–26.
- [57] W. W. Cleland. *The use of isotope effects to determine enzyme mechanisms*. Arch. Biochem. Biophys., **433** (2005) 2–12.
- [58] P. Paneth. *Chlorine Kinetic Isotope Effects on Enzymatic Dehalogenations*. Acc. Chem. Res., **36** (2003) 120–126.
- [59] A. Lewandowicz, J. Jemielity, M. Kanska, J. Zoń, P. Paneth. *Tritium secondary kinetic isotope effect on phenylalanine ammonia-lyase-catalyzed reaction*. Arch. Biochem. Biophys., **370** (1999) 216–221.

- [60] D. J. Gustin, P. Mattei, P. Kast, O. Wiest, L. Lee, W. W. Cleland, D. Hilvert. *Heavy atom isotope effects reveal a highly polarized transition state for chorismate mutase*. J. Am. Chem. Soc., **121** (1999) 1756–1757.
- [61] S. Martí, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, J. Bertrán. *Preorganization and Reorganization as Related Factors in Enzyme Catalysis: The Chorismate Mutase Case*. Chem. Eur. J., **9** (2003) 984–991.
- [62] S. E. Worthington, A. E. Roitberg, M. Krauss. *Kinetic isotope effects in the active site of B-subtilis chorismate mutase*. Int. J. Quant. Chem., **94** (2003) 287–292.
- [63] G. D. Ruggiero, S. J. Guy, S. Martí, V. Moliner, I. H. Williams. *Vibrational analysis of the chorismate rearrangement: relaxed force constants, isotope effects and activation entropies calculated for reaction in vacuum, water and the active site of chorismate mutase*. J. Phys. Org. Chem., **17** (2004) 592–601.
- [64] S. Martí, V. Moliner, I. Tuñón, I. H. Williams. *Computing Kinetic Isotope Effects for Chorismate Mutase with High Accuracy. A New DFT/MM Strategy*. J. Phys. Chem. B, **109** (2005) 3707–3710.
- [65] S.-L. Lee, T. W. Hepburn, W. H. Swartz, H. L. Ammon, P. S. Mariano, D. Dunaway-Mariano. *Stereochemical Probe for the Mechanism of P-C Bond Cleavage Catalyzed by the Bacillus cereus Phosphonoacetaldehyde Hydrolase*. J. Am. Chem. Soc., **114** (1992) 7346–7354.
- [66] M. C. Morais, W. Zhang, A. S. Baker, G. Zhang, D. Dunaway-Mariano, K. N. Allen. *The Crystal Structure of Bacillus cereus Phosphonoacetaldehyde Hydrolase: Insight into Catalysis of Phosphorus Bond Cleavage and Catalytic Diversification within the HAD Enzyme Superfamily*. Biochemistry, **39** (2000) 10385–10396.
- [67] M. R. Haynes, E. A. Stura, D. Hilvert, I. A. Wilson. *Routes to catalysis - structure of a catalytic antibody and comparison with its natural counterpart*. Science, **263** (1994) 646–652.
- [68] N. A. Khanjin, J. P. Snyder, F. M. Menger. *Mechanism of chorismate mutase: Contribution of conformational restriction to catalysis in the Claisen rearrangement*. J. Am. Chem. Soc., **121** (1999) 11831–11846.
- [69] M. Barbany, H. Gutiérrez-de-Terán, F. Sanz, J. Villà-Freixa, A. Warshel. *On the Generation of Catalytic Antibodies by Transition State Analogues*. ChemBioChem, **4** (2003) 277–285.

- [70] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne. *The Protein Data Bank*. *Nuc. Acids Res.*, **28** (2000) 235–242. Adres WWW: <http://www.pdb.org/>.
- [71] J. Zoń, B. Szefczyk, W. Sawka-Dobrowolska, R. Gancarz, M. Kucharska-Zoń, R. Latajka, N. Amrhein, P. Miziak, W. Szczepanik. *Experimental and ab initio calculated structures of 2-aminoindane-2-phosphonic acid, a potent inhibitor of phenylalanine ammonia-lyase, and theoretical studies of its binding to the model enzyme structure*. *New J. Chem.*, **28** (2004) 1048–1055.
- [72] L. Pielą. *Idee chemii kwantowej* (Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003).
- [73] S. Martí, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, J. Bertrán. *Transition structure selectivity in enzyme catalysis: a QM/MM study of chorismate mutase*. *Theor. Chem. Acc.*, **105** (2001) 207–212.
- [74] Y. S. Lee, S. E. Worthington, M. Krauss, B. R. Brooks. *Reaction Mechanism of Chorismate Mutase Studied by the Combined Potentials of Quantum Mechanics and Molecular Mechanics*. *J. Phys. Chem. B*, **106** (2002) 12059–12065.
- [75] K. E. Ranaghan, L. Ridder, B. Szefczyk, W. A. Sokalski, J. C. Hermann, A. J. Mulholland. *Insights into enzyme catalysis from QM/MM modelling: transition state stabilization in chorismate mutase*. *Mol. Phys.*, **101** (2003) 2695–2714.
- [76] A. Crespo, D. A. Scherlis, M. A. Martí, P. Ordejón, A. E. Roitberg, D. A. Estrin. *A DFT-Based QM-MM Approach Designed for the Treatment of Large Molecular Systems: Application to Chorismate Mutase*. *J. Phys. Chem. B*, **107** (2003) 13728–13736.
- [77] K. E. Ranaghan, L. Ridder, B. Szefczyk, W. A. Sokalski, J. C. Hermann, A. J. Mulholland. *Transition state stabilization and substrate strain in enzyme catalysis: ab initio QM/MM modelling of the chorismate mutase reaction*. *Org. Biomol. Chem.*, **2** (2004) 968–980.
- [78] R. Car, M. Parrinello. *Unified approach for molecular-dynamics and density-functional theory*. *Phys. Rev. Lett.*, **55** (1985) 2471–2474.
- [79] D. Marx, J. Hutter. *Ab initio molecular dynamics: Theory and Implementation*. *Modern Methods and Algorithms of Quantum Chemistry*, (Red. J. Grotendorst), tom 1, 301–449 (John von Neumann Institute for Computing, 2000).

- [80] Y. M. Chook, H. Ke, W. N. Lipscomb. *Crystal structures of the monofunctional chorismate mutase from Bacillus Subtilis and its complex with a transition state analog*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **90** (1993) 8600.
- [81] A. Y. Lee, P. A. Karplus, B. Ganem, J. Clardy. *Atomic-structure of the buried catalytic pocket of escherichia-coli chorismate mutase*. J. Am. Chem. Soc., **117** (1995) 3627–3628.
- [82] J. Ma, X. Zheng, G. Schnappauf, G. Braus, M. Karplus, W. N. Lipscomb. *Yeast chorismate mutase in the R state: Simulations of the active site*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **95** (1998) 14640–14645.
- [83] P. Kast, M. Asif-Ullah, D. Hilvert. *Is Chorismate Mutase a Prototypic Entropy Trap? — Activation Parameters for the Bacillus subtilis Enzyme*. Tetrahedron Lett., **37** (1996) 2691–2694.
- [84] P. Kast, Y. B. Tewari, O. Wiest, D. Hilvert, K. N. Houk, R. N. Goldberg. *Thermodynamics of the Conversion of Chorismate to Prephenate: Experimental Results and Theoretical Predictions*. J. Phys. Chem. B, **101** (1997) 10976–10982.
- [85] P. Kast, C. Grisostomi, I. A. Chen, S. Li, U. Krenzel, Y. Xue, D. Hilvert. *A Strategically Positioned Cation Is Crucial for Efficient Catalysis by Chorismate Mutase*. J. Biol. Chem., **275** (2000) 36832–36838.
- [86] A. Sehgal, L. Shao, J. Gao. *Transition Structure and Substituent Effects on Aqueous Acceleration of the Claisen Rearrangement*. J. Am. Chem. Soc., **117** (1995) 11337–11340.
- [87] S. Martí, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, J. Bertrán. *A QM/MM Study of the Conformational Equilibria in the Chorismate Mutase Active Site. The Role of the Enzymatic Deformation Energy Contribution*. J. Phys. Chem. B, **104** (2000) 11308–11315.
- [88] R. J. Hall, S. A. Hindle, N. A. Burton, I. H. Hillier. *Aspects of Hybrid QM/MM Calculations: The Treatment of the QM/MM Interface Region and Geometry Optimization with an Application to Chorismate Mutase*. J. Comp. Chem., **21** (2000) 1433–1441.
- [89] A. E. Roitberg, S. E. Worthington, M. J. Holden, M. P. Mayhew, M. Krauss. *The Electronic Spectrum of the Prephenate Dianion. An Experimental and Theoretical (MD/QM) Comparison*. J. Am. Chem. Soc., **122** (2000) 7312–7316.
- [90] S. E. Worthington, M. Krauss. *Effective fragment potentials and the enzyme active site*. Comp. Chem., **24** (2000) 275–285.

- [91] S. E. Worthington, A. E. Roitberg, M. Krauss. *An MD/QM Study of the Chorismate Mutase-Catalyzed Claisen Rearrangement Reaction*. J. Phys. Chem. B, **105** (2001) 7087–1095.
- [92] H. Guo, Q. Cui, W. N. Lipscomb, M. Karplus. *Understanding the Role of Active-Site Residues in Chorismate Mutase Catalysis from Molecular-Dynamics Simulations*. Angew. Chem. Int. Ed., **42** (2003) 1508–1511.
- [93] S. Martí, V. Moliner, I. Tuñón, I. H. Williams. *QM/MM calculations of kinetic isotope effects in the chorismate mutase active site*. Org. Biomol. Chem., **1** (2003) 483–487.
- [94] A. Warshel. *Computer simulations of Enzyme Catalysis: Methods, Progress, and Insights*. Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., **32** (2003) 425–443.
- [95] A. Keinhöfer, P. Kast, D. Hilvert. *Selective Stabilization of the Chorismate Mutase Transition State by a Positively Charged Hydrogen Bond Donor*. J. Am. Chem. Soc., **125** (2003) 3206–3207.
- [96] H. Guo, Q. Cui, W. N. Lipscomb, M. Karplus. *Substrate conformational transitions in the active site of chorismate mutase: Their role in the catalytic mechanism*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **98** (2001) 9032–9037.
- [97] M. P. Repasky, C. R. W. Guimarães, J. Chandrasekhar, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen. *Investigation of Solvent Effects for the Claisen Rearrangement of Chorismate to Prephenate: Mechanistic Interpretation via Near Attack Conformations*. J. Am. Chem. Soc., **125** (2003) 6663–6672.
- [98] S. D. Copley, J. R. Knowles. *The conformational equilibrium of chorismate in solution — implications for the mechanism of the nonenzymatic and the enzyme-catalyzed rearrangement of chorismate to prephenate*. J. Am. Chem. Soc., **109** (1987) 5008–5013.
- [99] S. Hur, T. C. Bruice. *Just a Near Attack Conformer for Catalysis (Chorismate to Prephenate Rearrangements in Water, Antibody, Enzymes, and Their Mutants)*. J. Am. Chem. Soc., **125** (2003) 10540–10542.
- [100] E. Y. Lau, T. C. Bruice. *Comparison of the Dynamics for Ground-State and Transition-State Structures in the Active Site of Catechol O-Methyltransferase*. J. Am. Chem. Soc., **122** (2000) 7165–7171.

- [101] S. Hur, T. C. Bruice. *The Mechanism of Cis–Trans Isomerization of Prolyl Peptides by Cyclophilin*. J. Am. Chem. Soc., **124** (2002) 7303–7313.
- [102] B. Schiøtt, T. C. Bruice. *Reaction Mechanism of Soluble Epoxide Hydrolase: Insights from Molecular Dynamics Simulations*. J. Am. Chem. Soc., **124** (2002) 14558–14570.
- [103] J. L. Pawlak, R. E. Padykula, J. D. Kronis, R. A. Aleksejczyk, G. A. Berchtold. *Structural requirements for catalysis by chorismate mutase*. J. Am. Chem. Soc., **111**.
- [104] D. Röther, L. Poppe, G. Morlock, S. Viergutz, J. Retey. *An active site homology model of phenylalanine ammonia-lyase from Petroselinum crispum*. Eur. J. Biochem., **269** (2002) 3065–3075.
- [105] J. C. Calabrese, D. B. Jordan, A. Boodhoo, S. Sariaslani, T. Vannelli. *Crystal Structure of Phenylalanine Ammonia Lyase: Multiple Helix Dipoles Implicated in Catalysis*. Biochemistry, **43** (2004) 11403–11416.
- [106] A. Kulczyk, B. Szefczyk, N. Amrhein, J. Zoń. *(E)-Cinnamic Acid Analogues as Inhibitors of Phenylalanine Ammonia-Lyase and of Anthocyanin Biosynthesis*. Pol. J. Chem., **79** (2005) 583–592.
- [107] T. F. Schwede, J. Rétey, G. E. Schulz. *Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile*. Biochemistry, **38** (1999) 5355–5361.
- [108] M. Baedeker, G. E. Schulz. *Autocatalytic Peptide Cyclization during Chain Folding of Histidine Ammonia-Lyase*. Structure, **10** (2002) 61–67.
- [109] N. Amrhein, K. H. Gödecke. *Alpha-aminoxy-beta-phenylpropionic acid - potent inhibitor of L-phenylalanine ammonia-lyase in vitro and in vivo*. Plant Sci. Letters, **8** (1977) 313–317.
- [110] B. Laber, H. H. Kiltz, N. Amrhein. *Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase in vitro and in vivo by (1-amino-2-phenylethyl)phosphonic acid, the phosphonic analog of phenylalanine*. Z. Naturforsch., **41** (1986) 49–55.
- [111] J. Zoń, N. Amrhein. *Inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase — 2-aminoindan-2-phosphonic acid and related-compounds*. Liebigs Ann. Chem., **6** (1992) 625–628.
- [112] A. van der Vaart, K. M. Merz, Jr. *Charge transfer in Biologically important molecules: Comparison of high-level ab initio and semiempirical methods*. Int. J. Quant. Chem., **77** (2000) 27–43.

- [113] A. Baeten, D. Maes, P. Geerlings. *Quantum chemical study of the catalytic triad in subtilisin: the influence of amino acid substitutions on enzymatic activity*. J. Theor. Biol., **195** (1998) 27–40.
- [114] F. Weinhold. *Nature of H-bonding in clusters, liquids, and enzymes: an ab initio, natural bond orbital perspective*. J. Mol. Struct. (THEOCHEM), **398** (1997) 181–197.
- [115] R. S. Mulliken. *Electronic population analysis on LCAO-MO molecular wave functions .1.* J. Chem. Phys., **23** (1955) 1833–1840.
- [116] W. A. Sokalski. *Improved procedure for analysis of electron density redistribution in molecular complexes*. J. Chem. Phys., **77** (1982) 4529–4541.
- [117] W. A. Sokalski, P. Kędzierski, J. Grembecka. *Ab initio study of the physical nature of interactions between enzyme active site fragments in vacuo*. Phys. Chem. Chem. Phys., **3** (2001) 657–663.
- [118] P. Dziekoński, W. A. Sokalski, E. Kassab, M. Allavena. *Electrostatic nature of catalytic effects resulting from Si → Al substitutions in ZMS-5 zeolite*. Chem. Phys. Lett., **288** (1998) 538–544.
- [119] P. Dziekoński, W. A. Sokalski, B. Szyja, J. Leszczyński. *Physical nature of catalytic effects of Si → Al substitutions in ZMS-5 zeolite for propylene protonation reaction*. Chem. Phys. Lett., **364** (2002) 133–138.
- [120] L. Gorb, Y. Podolyan, P. Dziekoński, W. A. Sokalski, J. Leszczyński. *Double-proton transfer in Adenine-Thymine and Guanine-Cytosine base pairs. A post-hartree-fock ab initio study*. J. Am. Chem. Soc., **126** (2004) 10119–10129.
- [121] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus. *CHARMM - a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations*. J. Comp. Chem., **4** (1983) 187–217.
- [122] P. D. Lyne, M. Hodoscek, M. Karplus. *A hybrid QM-MM potential employing Hartree-Fock or density functional methods in the quantum region*. J. Phys. Chem. A, **103** (1999) 3462–3471.
- [123] M. W. Schmidt, K. K. Baldridge, J. A. Boatz, S. T. Elbert, M. S. Gordon, J. H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K. A. Nguyen, S. J. Su, T. L. Windus, M. Dupuis. *General atomic and molecular electronic-structure system*. J. Comput. Chem., **14** (1993) 1347–1363.

- [124] A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiorkiewicz-Kuczera, D. Yin, M. Karplus. *All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins*. J. Phys. Chem. B, **102** (1998) 3586–3616.
- [125] C. L. Brooks III, M. Karplus. *Deformable stochastic boundaries in molecular-dynamics*. J. Chem. Phys., **79** (1983) 6312–6325.
- [126] W. A. Sokalski. *The physical nature of catalytic activity due to the molecular environment in terms of intermolecular interaction theory: derivation of simplified models*. J. Mol. Catalysis, **30** (1985) 395–410.
- [127] A. Warshel. *Energetics of Enzyme Catalysis*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**.
- [128] M. J. S. Dewar, D. M. Storch. *Alternative view of enzyme reactions*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **82** (1985) 2225–2229.
- [129] K. Szalewicz, B. Jeziorski. *Symmetry-adapted Perturbation Theory of Intermolecular Interactions*. Molecular Interactions, (Red. S. Scheiner), 4–43 (Wiley, 1997).
- [130] K. Kitaura, K. Morokuma. *New energy decomposition scheme for molecular-interactions within hartree-fock approximation*. Int. J. Quant. Chem., **10** (1976) 325–340.
- [131] W. A. Sokalski, S. Roszak. *Efficient techniques for the decomposition of intermolecular interaction energy at SCF level and beyond*. J. Mol. Struct., **234** (1991) 387–400.
- [132] W. A. Sokalski. *Nonempirical Modelling of Intermolecular Interactions and Electrostatic Effects in Biomolecules*. Theoretical Biochemistry and Molecular Biophysics, Volume 2: Proteins, (Red. D. L. Beveridge, R. Lavery), 239–256 (Adenine Press, 1991).
- [133] W. A. Sokalski, P. Kędzierski, J. Grembecka, P. Dziekoński, K. Strasburger. *Theoretical Tools for Analysis and Modelling Electrostatic Effects in Biomolecules*. Computational Molecular Biology, (Red. J. Leszczyński), 369–396 (Elsevier Science, 1999).
- [134] R. Góra, S. Roszak, W. A. Sokalski, J. Leszczyński (1999). Jacson State University Reprint.

- [135] R. W. Góra, W. Bartkowiak, S. Roszak, J. Leszczynski. *A New Theoretical Insight into the Nature of Intermolecular Interactions in the Molecular Crystal of Urea*. J. Chem. Phys., **117** (2002) 1031–1039.
- [136] R. W. Góra, W. Bartkowiak, S. Roszak, J. Leszczynski. *Intermolecular interactions in solution: Elucidating the influence of the solvent*. J. Chem. Phys., **120** (2004) 2802–2813.
- [137] S. F. Boys, F. Bernardi. *Calculation of small molecular interactions by differences of separate total energies - some procedures with reduced errors*. Mol. Phys., **19** (1970) 553–556.
- [138] W. A. Sokalski, R. A. Poirier. *Cumulative atomic multipole representation of the molecular charge distribution and its basis set dependence*. Chem. Phys. Lett., **98** (1983) 86–92.
- [139] W. A. Sokalski, A. Sawaryn. *Correlated molecular and cumulative atomic multipole moments*. J. Chem. Phys., **87** (1987) 526–534.
- [140] A. J. Stone. *Distributed multipole analysis, or how to describe a molecular charge-distribution*. Chem. Phys. Lett., **83** (1981) 233–239.
- [141] W. A. Sokalski. *Nonempirical modeling of the static and dynamic properties of the optimum environment for chemical reactions*. J. Mol. Struct. (THEOCHEM), **138** (1986) 77–87.
- [142] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Menucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople. Gaussian 03, Revision B.04 (Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003).
- [143] W. Schroeder, K. Martin, B. Lorenzen. *The Visualization Toolkit. An Object-Oriented Approach to 3D Graphics* (Kitware, Inc., USA, 2002).

- [144] T. Pang. *Metody obliczeniowe w fizyce. Fizyka i komputery.* (Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2001).
- [145] P. Dziekonski, W. A. S. Y. Podolyan, J. Leszczynski. *Nonempirical analysis of the catalytic activity of the molecular environment - optimal static and dynamic catalytic fields for double proton transfer in formamide-formamidine complex.* Chem. Phys. Lett., **367** (2003) 367–375.
- [146] W. A. Sokalski. *Theoretical Model for Exploration of Catalytic Activity of Enzymes and Design of New Catalysts: CO₂ Hydration Reaction.* Int. J. Quant. Chem., **20** (1981) 231–240.
- [147] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M. C. Peitsch. *SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server.* Nuc. Acid Res., **31** (2003) 3381–3385.
- [148] C. B. Anfinsen. *Principles that govern folding of protein chains.* Science, **181** (1973) 223–230.
- [149] R. Garg, S. P. Gupta, H. Gao, M. S. Babu, A. K. Debnath, C. Hansch. *Comparative Quantitative Structure–Activity Relationship Studies on Anti-HIV Drugs.* Chem. Rev., **99** (1999) 3525–3601.
- [150] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson. *Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function.* J. Comp. Chem., **19** (1998) 1639–1662.
- [151] C. M. Breneman, K. B. Wiberg. *Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials – the need for high sampling density in formamide conformational analysis.* J. Comp. Chem., **11** (1990) 361–373.
- [152] T. H. Dunning. *Gaussian-basis sets for use in correlated molecular calculations .1. the atoms boron through neon and hydrogen.* J. Chem. Phys., **90** (1989) 1007–1023.
- [153] R. A. Kendall, T. H. Dunning, R. J. Harrison. *Electron-affinities of the 1st-row atoms revisited - systematic basis-sets and wave-functions.* J. Chem. Phys., **96** (1992) 6796–6806.
- [154] D. E. Woon, T. H. Dunning. *Gaussian-basis sets for use in correlated molecular calculations .3. the atoms aluminum through argon.* J. Chem. Phys., **98** (1993) 1358–1371.
- [155] R. F. W. Bader. *Atoms in Molecules. A Quantum Theory.*, tom 22 z serii *International Series of Monographs in Chemistry* (Oxford University Press, Oxford, UK, 1990).

- [156] A. E. Reed, R. B. Weinstock, F. Weinhold. *Natural-population analysis*. J. Chem. Phys., **83** (1985) 735–746.
- [157] L. E. Chirlian, M. Francl. *Atomic Charges Derived from Electrostatic Potentials: A Detailed Study*. J. Comp. Chem., **8** (1987) 894–905.
- [158] S. M. Bachrach. *Population Analysis and Electron Densities from Quantum Mechanics*. Reviews in Computational Chemistry, (Ed. K. B. Lipkowitz, D. B. Boyd), tom 5, rozdział 3, 171–227 (VCH, 1994).
- [159] A. D. Becke, K. E. Edgecombe. *A simple measure of electron localization in atomic and molecular-systems*. J. Chem. Phys., **92** (1990) 5397–5403.
- [160] C. H. Townes, B. P. Dailey. *Determination of Electronic Structure of Molecules from Nuclear Quadrupole Effects*. J. Chem. Phys., **17** (1949) 782–796.
- [161] M. Canagaratna, M. E. Ott, K. R. Leopold. *Determination of the dipole moment of H_3N-SO_3 in the gas phase*. Chem. Phys. Lett., **281** (1997) 63–68.
- [162] W. A. Burns, J. A. Phillips, M. Canagaratna, H. Goodfriend, K. R. Leopold. *Partially formed bonds in $HCN-SO_3$ and CH_3CN-SO_3 : A comparison between donor-acceptor complexes of SO_3 and BF_3* . J. Phys. Chem. A, **103** (1999) 7445–7453.
- [163] D. L. Fiacco, A. Toro, K. R. Leopold. *Structure, Bonding, and Dipole Moment of $(CH_3)_3N-SO_3$. A Microwave Study*. Inorg. Chem., **39** (2000) 37–43.
- [164] A. C. Legon, J. M. A. Thumwood. *A π -electron donor-acceptor complex $C_2H_4 \cdots Br_2$ characterised by its rotational spectrum*. Phys. Chem. Chem. Phys., **3** (2001) 1397–1402.
- [165] D. L. Fiacco, Y. Mo, S. W. Hunt, M. E. Ott, A. Roberts, K. R. Leopold. *Dipole moments of partially bound Lewis Acid–Base Adducts*. J. Phys. Chem. A, **105** (2001) 484–493.
- [166] G. Naray-Szabo. *Quantum Chemical Calculation of the Enzyme-Ligand Interaction Energy for Trypsin Inhibition by Benzamidines*. J. Am. Chem. Soc., **106** (1984) 4584–4589.
- [167] W. A. Sokalski, M. Shibata, D. Barak, R. Rein. *Catalytic Activity of Aminoacyl tRNA Synthetases and Its Implications for the Origin of Life I. Aminoacyl Adenylate Formation in Tyrosyl tRNA Synthetase*. J. Mol. Evol., **33** (1991) 405–411.

- [168] P. Szarek, E. Dyguda, W. A. Sokalski, J. A. McCammon. W przygotowaniu.
- [169] E. Dyguda, B. Szefczyk, W. A. Sokalski. *The Mechanism of Phosphoryl Transfer Reaction and the Role of Active Site Residues on the Basis of Ribokinaze-Like Kinases*. *Int. J. Mol. Sci.*, **5** (2004) 141–153.
- [170] C. Appert, J. Zoń, N. Amrhein. *Kinetic analysis of the inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by 2-aminoindan-2-phosphonic acid and other phenylalanine analogues*. *Phytochemistry*, **62** (2003) 415–422.
- [171] Y. R. Mo, J. L. Gao. *Polarization and charge-transfer effects in Lewis acid-base complexes*. *J. Phys. Chem. A*, **105** (2001) 6530–6536.

Spis rysunków

1.1	Reakcja izomeryzacji choryzmianu do preferianu oraz numeracja atomów stosowana w choryzmianie.	12
1.2	Struktura mutazy choryzmianowej z <i>Bacillus subtilis</i>	14
1.3	Reakcja eliminacji cząsteczki amoniaku z (S)-fenyloalaniny, katalizowana przez amoniakoliazę fenyloalaninową (PAL). . .	16
1.4	3,5-dihydro-5-metylideno-4 <i>H</i> -imidazol-4-on, grupa prostetyczna amoniakoliazы fenyloalaninowej.	17
1.5	Wybrane inhibitory amoniakoliazы fenyloalaninowej	18
2.1	Różnicowa stabilizacja stanu przejściowego.	23
2.2	Model centrum aktywnego mutazy choryzmianowej	31
2.3	Idea statycznego pola katalitycznego.	32
2.4	Idea zewnętrznego i wewnętrznego pola katalitycznego.	34
3.1	Różnicowa stabilizacja stanu przejściowego w mutazie choryzmianowej — wkłady poszczególnych reszt do obniżenia bariery aktywacji.	46
3.2	Statyczne pole katalityczne reakcji przegrupowania choryzmianu	49
3.3	Statyczne pole katalityczne reakcji przegrupowania choryzmianu w płaszczyźnie wiązania zrywanego (C–O3, pogrubiona linia ciągła) i tworzonego (C3–C9, pogrubiona linia przerywana) w trakcie reakcji.	50
3.4	Porównanie wybranych reszt konserwatywnych w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej z organizmów <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> i <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
3.5	Wewnętrzne pole katalityczne dla reakcji przegrupowania choryzmianu do preferianu.	54
3.6	Najkrótsze kontakty w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej.	57
3.7	Wpływ konformacji grupy hydroksylowej choryzmianu/TS na obniżenie bariery aktywacji	57

3.8	Wpływ konformacji grupy hydroksylowej choryzmianu/TS na obniżenie bariery aktywacji, Δ w obecności cysteiny	58
3.9	Wpływ odległości glutaminianu Glu78 od choryzmianu/TS na obniżenie bariery aktywacji	59
3.10	Wpływ odległości pomiędzy arginina Arg90, a substratem (r_S) i stanem przejściowym (r_{TS}).	60
3.11	Geometria form AC-d, TS-d i EC-d inhibitora AIP, obliczona na poziomie metody HF/6-31G(d).	62
3.12	Histogramy ilustrujące ilość i wielkość klastrów konformacji dla dwunastu form AIP zadokowanych w PAL.	64
3.13	Rezultat dokowania dwunastu form inhibitora AIP do enzymu PAL.	65
3.13	(kontynuacja ze strony 65)	66
3.14	Odległości w kompleksach PAL z inhibitorem AIP	68
3.15	Struktura modelowych układów do obliczeń międzycząsteczkowego przeniesienia ładunku.	70
3.16	Średni błąd względny przeniesienia ładunku w różnych modelach ładunków punktowych obliczony metodą DFT/B3LYP w bazach funkcyjnych cc-pVXZ ($X = D, T, Q$).	70
3.17	Porównanie wartości CT wyznaczonych metodą AIM na poziomie metody DFT/B3LYP dla kompleksów HCN·SO ₃ , CH ₃ CN·SO ₃ , H ₃ N·SO ₃ , H ₃ N·BF ₃ , z wartościami eksperymentalnymi.	75
3.18	Współczynnik korelacji pomiędzy eksperymentalnymi i teoretycznymi wartościami CT dla różnych poziomów teorii i modeli ładunków punktowych.	75
3.19	Średni błąd względny przeniesienia ładunku obliczonego w modelu Chelpg na różnych poziomach teorii w bazach funkcyjnych cc-pVXZ ($X = D, T, Q$).	76

Spis tabel

3.1	Składowe energii oddziaływania w kompleksie z choryzmianem	41
3.2	Składowe energii oddziaływania w kompleksie ze stanem przejściowym	42
3.3	Różnicowa stabilizacja stanu przejściowego Δ w mutacji choryzmianowej	43
3.4	Wpływ orientacji grupy hydroksylowej w choryzmianie/TS na wysokość bariery aktywacji	55
3.5	Wpływ odległości Glu78–choryzmian/TS na obniżenie bariery aktywacji Δ	55
3.6	Energia formy AC i stanu przejściowego (TS) względem formy EC dla możliwych stanów sprotonowania AIP	61
3.7	Względne energie form AC, TS, EC inhibitora AIP na różnych poziomach teorii.	62
3.8	Dokowanie form AC-, EC-, a-f inhibitora AIP do centrum aktywnego PAL.	63
3.9	Przeniesienie ładunku w kompleksach typu kwas–zasada Lewisa na poziomie metody Hartree-Focka.	71
3.10	Przeniesienie ładunku w kompleksach typu kwas–zasada Lewisa na poziomie metody DFT (funkcjonał B3LYP).	72
3.11	Przeniesienie ładunku w kompleksach typu kwas–zasada Lewisa na poziomie metody MP2.	73
3.12	Przeniesienie ładunku w kompleksach typu kwas–zasada Lewisa na poziomie metody sprzężonych klasterów z podwójnymi wzbudzeniami (CCD).	74
3.13	Średni błąd względny przeniesienia ładunku obliczony dla teoretycznych wartości CT względem wyników eksperymentalnych	74
3.14	Składowe energii oddziaływania międzycząsteczkowego w kompleksach typu kwas–zasada Lewisa	78

Spis treści

1	Wprowadzenie	3
1.1	Aktywność katalityczna enzymów	4
1.2	Systematyka efektów katalitycznych	5
1.3	Metody badania efektów katalitycznych	8
1.4	Mutaza choryzmianowa	12
1.5	Amoniakoliza fenyloalaninowa	16
1.6	Przeniesienie ładunku w układach biologicznych	17
1.7	Cel pracy	20
2	Metodyka badań	21
2.1	Obliczenia QM/MM	21
2.2	Różnicowa stabilizacja stanu przejściowego	22
2.3	Oddziaływania międzycząsteczkowe	24
2.4	Model centrum aktywnego	30
2.5	Pole katalityczne	30
2.6	Dokowanie inhibitorów w centrum aktywnym	35
2.7	Międzcząsteczkowe przeniesienie ładunku	37
3	Wyniki badań	40
3.1	Oddziaływania w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej	40
3.2	Statyczne pole katalityczne mutazy choryzmianowej	47
3.3	Dynamiczne pole katalityczne mutazy choryzmianowej	53
3.4	Konformacyjna stabilizacja stanu przejściowego	53
3.5	Inhibicja amoniakolizy fenyloalaninowej	61
3.6	Międzcząsteczkowe przeniesienie ładunku	68
4	Podsumowanie	79
	Spis publikacji i wystąpień konferencyjnych	83
	Bibliografia	86
	Spis rysunków	102

<i>SPIS TREŠCI</i>	106
Spis tabel	104
Spis trešci	105