

PRACA DOKTORSKA

Badania natury oddziaływań w centrach aktywnych enzymów

mgr inż. Paweł Kędzierski

Pracę wykonano w Instytucie Chemii Fizycznej i Teoretycznej
Politechniki Wrocławskiej

Promotor: dr hab. inż W. Andrzej Sokalski, prof. PWr

Wrocław, 2001

Składam gorące podziękowania prof. Andrzejowi Sokalskiemu, bez którego opieki i wsparcia powstanie tej pracy nie byłoby możliwe.

mojej Żonie

Podziękowania

- *promotorowi, za wsparcie w trudnych momentach;*
- *panom R.W. Górze oraz A. Nowkowi, za udostępnienie zmodyfikowanych wersji programu GAMESS, używanych do obliczeń;*
- *pani J. Grembeckiej, za udostępnienie niektórych wyników;*
- *żonie, za cierpliwość i wsparcie w czasie powstawania tej pracy;*
- *teściom, za wielostronną pomoc;*
- *oraz wszystkim innym, którzy przyczynili się do powstania tej pracy.*

Spis treści

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Wstęp | 3 |
| 1.1 | Natura oddziaływań międzycząsteczkowych | 5 |
| 1.2 | Dotychczasowe poglądy na naturę katalizy i inhibicji enzymatycznej | 14 |
| 1.3 | Przybliżone modele oddziaływań | 18 |
| 1.3.1 | Wielocentrowe rozwinięcia multipolowe | 19 |
| 1.3.2 | Hierarchia modeli teoretycznych | 21 |
| 1.4 | Cele badań | 23 |
| 2 | Metody obliczeniowe | 24 |
| 2.1 | Badane efekty różnicowe | 24 |
| 2.1.1 | Stałe wiązania i inhibicji | 25 |
| 2.1.2 | Analiza katalitycznej roli elementów centrum aktywnego | 25 |
| 2.1.3 | Wpływ mutacji na zmiany pK_a aminokwasów | 26 |
| 2.2 | Nieempiryczna analiza natury oddziaływań | 27 |
| 2.3 | Przybliżone modele oddziaływań elektrostatycznych | 28 |
| 2.3.1 | Atomowe momenty multipolowe | 29 |
| 2.3.2 | Modele elektrostatyczne oparte na ładunkach punktowych | 31 |
| 2.3.3 | Porównanie jakości modeli przybliżonych | 31 |
| 2.4 | Oprogramowanie | 33 |
| 3 | Analiza natury oddziaływań dla wybranych układów enzymatycznych | 34 |
| 3.1 | Efekty katalityczne w centrum aktywnym rybonukleazy A | 34 |
| 3.1.1 | Natura wpływu katalitycznego poszczególnych reszt | 36 |
| 3.1.2 | Wpływ stanu protonacji reszt na ich aktywność katalityczną | 38 |
| 3.1.3 | Natura oddziaływań katalitycznych w funkcji odległości | 42 |
| 3.2 | Analiza natury oddziaływań w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej | 49 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4 | Analiza jakości i przenośności anizotropowych modeli rozkładu ładunku | 53 |
| 4.1 | Odtwarzanie MEP oraz energii oddziaływań | 53 |
| 4.1.1 | Biblioteka CAMM dla aminokwasów | 53 |
| 4.1.2 | Potencjał elektrostatyczny donorów i akceptorów wiązań wodorowych | 54 |
| 4.1.3 | Odtwarzanie rozkładu potencjału na powierzchni cząsteczki | 57 |
| 4.1.4 | Wrażliwość modelu CAMM na zmiany konformacji | 57 |
| 4.2 | Analiza międzycząsteczkowej przenośności CAMM | 64 |
| 4.2.1 | Przenośność CAMM między cząsteczkami o podobnej topologii . . . | 66 |
| 4.2.2 | Przenośność CAMM między różnymi otoczeniami molekularnymi . | 70 |
| 5 | Zastosowania uproszczonych modeli elektrostatycznych | 77 |
| 5.1 | Przewidywanie efektów mutacji w subtylizynie | 78 |
| 5.2 | Przewidywanie aktywności inhibitorów leucyloaminopeptydazy | 82 |
| 5.3 | Przewidywanie aktywności katalitycznej reszt aminokwasowych w synteta- zach aminoacylo-tRNA | 87 |
| 6 | Podsumowanie i wnioski | 92 |
| | Literatura | 95 |
| | Wykaz stosowanych skrótów | 107 |
| | Spis rysunków | 111 |
| | Spis tabel | 113 |

Rozdział 1

Wstęp

W ostatnich latach, dużym zainteresowaniem cieszy się problem teoretycznego modelowania własności biocząsteczek, stymulowany z jednej strony szybkim rozwojem metod eksperymentalnych biochemii i biologii molekularnej, z drugiej zaś rosnącymi osiągnięciami w obszarze badań podstawowych, zwłaszcza w zakresie korelacji między strukturą i funkcją makrocząsteczek. Badania w tym zakresie tworzą podwaliny dla praktycznych zastosowań inżynierii materiałowej, poszukiwań biokatalizatorów, nowych leków i środków ochrony roślin. Obliczenia dla tak dużych układów molekularnych stawiają szczególne wymagania.

Duża złożoność układów biomolekularnych czyni modelowanie katalizy enzymatycznej praktycznie niemożliwym bez wprowadzenia drastycznych uproszczeń. Uzyskanie wartościowych z punktu widzenia chemika wyników wymaga stosowania kosztownego aparatu obliczeniowego metod nieempirycznych, a to ogranicza zastosowania do stosunkowo niewielkich układów, oraz do małej liczby punktów na hiperpowierzchni energii potencjalnej (ang. *potential energy surface*, PES). Z drugiej strony, rozmiary reagentów oraz modeli centrów aktywnych enzymów wymuszają stosowanie mniej kosztownych metod przybliżonych. Praktycznie, górną granicą obecnych możliwości obliczeniowych jest nieempiryczne modelowanie ścieżek reakcji z uwzględnieniem tylko niektórych reszt centrum aktywnego [1–4].

W większości prac poświęconych reakcjom enzymatycznym, na poziomie budowy modelu reagującego układu podejmowane są arbitralne decyzje co do istotności reszt biorących udział w reakcji, ich stanów sprotonowania, a także modelu teoretycznego — czyli składników wyrażenia na energie oddziaływań. Często prowadzi to do sytuacji, gdy metody teoretyczne dają wyniki jakościowe, mogące służyć tylko pomocniczo w interpretacji wyników eksperymentalnych (np. [5]). Decyzje takie oparte są na dostępnej wiedzy literaturowej, głównie interpretacji wyników eksperymentalnych, oraz na bazie uproszczonych rozważań fizykochemicznych i doświadczenia, składających się na tzw. intuicję chemiczną, a uzyskane wyniki są funkcją przyjętych założeń [6]. Z uwagi na wielkość układu, do-

stępne narzędzia teoretyczne nie pozwalały dotąd zweryfikować takich założeń w oparciu o szczegółową analizę fizycznej natury oddziaływań, jak również systematycznie ocenić wielkości błędów popełnianych przy stosowaniu modeli przybliżonych. Do niedawna, nie były dostępne metody nieempiryczne pozwalające na dokonanie szczegółowej analizy oddziaływań w układach na tyle dużych, aby były interesujące z punktu widzenia badań nad biokatalizą lub inhibicją. Rozwiązanie tych problemów stało się możliwe przy zastosowaniu wariacyjno-perturbacyjnej dekompozycji energii oddziaływań [7], która w połączeniu z implementacją bezpośredniej metody pola samouzgodnionego (ang. *direct self-consistent field*, *direct SCF*) [8] umożliwia badania znacznie większych układów, niż to było dotychczas możliwe (do ok. 1000 orbitali atomowych). Z tego względu, analiza natury energii oddziaływań w centrach aktywnych enzymów, prezentowana w dalszej części tej pracy, stanowi unikalne przedsięwzięcie w literaturze przedmiotu.

Dla dokładnego modelowania reakcji biochemicznych duże znaczenie ma możliwie jak najwyższa jakość przyjętego modelu teoretycznego. W idealnym przypadku, powinny zostać uwzględnione: wpływ rozpuszczalnika, efekty entropowe, oscylacyjne, korelacja elektronowa oraz wiele innych. Niestety, koszt obliczeniowy związany z uwzględnieniem niektórych efektów może być olbrzymi, nawet dla względnie małych układów molekularnych. Przykładowo obliczenia entalpii swobodnej wymagają zastosowania aparatu teoretycznego termodynamiki statystycznej — konieczne jest wygenerowanie licznego zestawu mikrostanów, spełniającego z dobrym przybliżeniem podstawowe założenie ergodyczności. Przy uwzględnieniu wszystkich stopni swobody reagującego układu, wraz z otoczeniem (enzym, rozpuszczalnik, przeciwjony itp.), przeprowadzenie takich obliczeń jest obecnie prowadzone głównie przy użyciu metod statystycznych (ang. *Monte Carlo*, MC) lub dynamiki molekularnej (ang. *molecular dynamics*, MD), wykorzystujących ponadto maksymalnie uproszczone funkcje potencjału (ang. *molecular mechanics*, MM) zwane polami siłowymi (ang. *forcefield*, FF). Natomiast nieempiryczny opis wymagany dla reakcji chemicznych, często z uwzględnieniem korelacji elektronowej, ogranicza znacznie zarówno rozmiar układu, jak i praktycznie dostępną liczbę punktów przestrzeni fazowej. Z tego względu, przy modelowaniu reakcji lub oddziaływań dużych cząsteczek, efekty wymagające znacznego rozszerzenia układu lub próbkowanej przestrzeni fazowej często są pomijane lub tylko zgrubnie oceniane. Tymczasem, znajomość natury oddziaływań pozwoliłaby często uprościć opis teoretyczny tak dalece, że możliwe stałoby się znaczne rozszerzenie modelu. Przykłady zastosowań takich przybliżeń w obliczeniach zmian pK_a oraz stałych inhibicji enzymatycznej są prezentowane w rozdziale 5 tej pracy.

Współcześnie zauważalny jest szybki rozwój metod teoretycznych, pozwalających na pełen opis coraz większych układów. Przy użyciu zyskującej ostatnio coraz większą popu-

larność dynamiki *ab initio* (AIMD) w ujęciu Car-Parrinello [9], możliwe jest generowanie statystycznie znaczących zbiorów mikrostanów dla układów o rozmiarach rzędu kilkunastu do kilkudziesięciu atomów [10–12]. Metoda Car-Parrinello, dzięki połączeniu optymalizacji funkcji falowej z optymalizacją geometrii układu, oraz zbieżnemu całkowaniu sił Hellmanna-Feynmana, pozwoliła znacznie przyspieszyć obliczenia AIMD. Narzuca ona jednak inne ograniczenia, związane z użyciem fal płaskich jako bazy funkcyjnej. Ponadto układy kilkunastoatomowe są wciąż zbyt małe z punktu widzenia zastosowań dla badania reakcji enzymatycznych oraz oddziaływań biocząsteczek w roztworze. Dlatego w tym obszarze większą popularność zdobywają ostatnio metody hybrydowe QM/MM (ang. *coupled quantum mechanics and molecular mechanics*) [13–16]. Stanowią one praktyczny kompromis między poziomem teorii wymaganym do prawidłowego modelowania reakcji, a przybliżeniem koniecznym dla obliczeń wkładów entropowych. Metody te wymagają jednak dokonania arbitralnego podziału układu na podukłady modelowane różnymi metodami, więc i w tym przypadku konieczna jest wiedza *a priori* co do istotności grup centrum aktywnego, roli cząsteczek rozpuszczalnika, kofaktorów etc. Ponadto, dobór odpowiedniego zestawu metod powinien być uzasadniony odpowiednim kompromisem między ich dokładnością a kosztem.

Jeszcze trudniejsze, ze względu na ogólność przedmiotu, są decyzje dotyczące uproszczeń niezbędnych przy konstrukcji pól siłowych (FF). Mimo że ostatnie lata przyniosły znaczny rozwój nieempirycznych metod obliczeniowych, wciąż trudno oczekiwać w najbliższym czasie możliwości generowania metodami *ab initio* co najmniej milionowych liczb mikrostanów dla dużych układów. Najbardziej obiecujące algorytmy, oparte na metodzie pola samouzgodnionego (SCF) lub funkcyjonału gęstości (ang. *density functional theory*, DFT), umożliwiające uzyskanie do liniowej skalowalności kosztu obliczeń względem rozmiaru układu — $O(N)$, pozwalają obecnie zaledwie na pojedyncze obliczenia dla układów o rozmiarach rzędu tysięcy atomów [17]. Tym bardziej cenne są badania prowadzące do systematycznej oceny poziomu teorii niezbędnego do jakościowo oraz przynajmniej półilościowo poprawnego opisu zjawisk katalitycznych i inhibicji.

1.1 Natura oddziaływań międzycząsteczkowych

Niezależnie od użytego przybliżenia, pełen opis oddziaływań związanych z efektami katalitycznymi lub inhibicyjnymi powinien uwzględniać wszystkie efekty składające się na entalpię (energię) swobodną oddziaływania. Dla celów tej pracy, ograniczono rozważania do przybliżenia dwuczłonowego:

$$\Delta\mathcal{G}_{A,B} = \Delta\mathcal{H}_{A,B} - T\Delta\mathcal{S}_{A,B} \quad (1.1)$$

W większości przypadków, gdy nie występują sprzężenia między wkładami energetycznymi o różnej naturze (np. sprzężenia rotacyjno-wibracyjne), zmiany entalpii $\Delta\mathcal{H}_{A,B}$ i entropii $\Delta\mathcal{S}_{A,B}$ można z dobrym przybliżeniem zapisać jako sumę następujących składowych:

$$\Delta\mathcal{H}_{A,B} = \Delta H_{elektr} + \Delta H_{tr} + \Delta H_{rot} + \Delta H_{osc} + \Delta H_{solv} + \Delta(pV) \quad (1.2)$$

$$\Delta\mathcal{S}_{A,B} = \Delta S_{elektr} + \Delta S_{tr} + \Delta S_{rot} + \Delta S_{osc} + \Delta S_{solv} \quad (1.3)$$

gdzie składowa ΔH_{elektr} będzie w tej pracy uważana za równą różnicy energii elektronowych ΔE (w przybliżeniu Borna–Oppenheimera), natomiast ΔS_{elektr} jest w większości przypadków równa zero (tj. wtedy, gdy na ścieżce reakcji nie zachodzi zmiana multipletowości funkcji falowej).

W zależności od przypadku, w powyższych rozwinięciach można skorzystać z różnych uproszczeń. W przypadku katalizy enzymatycznej, zachodzącej z reguły w roztworze, można pominąć człon $\Delta(pV)$. Ponadto, w przypadku gdy badania ograniczamy do porównań oddziaływań w centrum aktywnym enzymu, można pominąć różnice entalpii translacyjnych ΔG_{tr} i rotacyjnych ΔG_{rot} ze względu na unieruchomienie reagentów względem białka. Nawet w pozostałych przypadkach, wyrażenia na ΔG_{tr} i ΔG_{rot} są względnie proste dla niewielkich cząsteczek.

Znacznie poważniejszym wyzwaniem jest natomiast obliczenie różnic entalpii oscylacyjnej ΔG_{osc} , co do których nie można założyć, że są pomijalne. Nawet dla oddziaływań wiążących, które mogą być poddane analizie wibracyjnej z użyciem przybliżenia oscylatora harmonicznego, obliczenia ΔG_{osc} są stosunkowo kosztowne ze względu na ilość stopni swobody układu. W przypadku badań katalizy heterogenicznej, w szczególności enzymatycznej, większość oddziaływań między reagentami i katalizatorem ma charakter niewiązący. W tym przypadku, krzywe potencjału są silnie anharmoniczne, w dodatku ze względu na płytki i szeroki charakter minimum energetycznego liczba dostępnych poziomów oscylacyjnych o energii porównywalnej z $k_B T$ może być większa niż jeden. Trudności te powodują konieczność stosowania numerycznej analizy oscylacyjnej, wysoce dokładnych metod obliczeniowych uwzględniających korelację elektronową oraz dużych baz z funkcjami polaryzacyjnymi i dyfuzyjnymi. Możliwości takie są obecnie dostępne tylko dla oddziaływań

stosunkowo małych cząsteczek, a obliczenia tego typu są wciąż stosunkowo rzadko wykonywane. Z tych powodów, mimo potencjalnie istotnego charakteru różnic entalpii oscylacji, w bieżącej pracy analiza ich wkładu do inhibicji i katalizy enzymatycznej nie mogła być przedmiotem obliczeń.

Ze względu na rozmiar badanych układów, uwzględnienie *explicite* cząsteczek powłoki solwatacyjnej, dla oszacowania różnicowych efektów ΔH_{solv} i ΔS_{solv} również nie było możliwe. Wartości entalpii swobodnej solwatacji zwykle oszacowywane są metodami przybliżonymi [18]; przyjęcie takiego rozwiązania zaciemniło by tylko obraz przeprowadzonej analizy, powodując włączenie w wartości obliczonych nieempirycznie energii oddziaływań efektów wielociałowych o nieokreślonej dokładności. Zamiast tego, przeanalizowano bezpośrednio energie wiązania lub stabilizacji ligandów przez najistotniejsze grupy otoczenia.

Szczęśliwie, można wyróżnić sporą klasę przypadków, kiedy wymienione przybliżenia nie powodują istotnych błędów. Z punktu widzenia praktycznego modelowania zjawisk inhibicji i katalizy enzymatycznej, zwykle najistotniejsze są różnice w oddziaływaniach z centrum aktywnym. Zarówno projektowanie inhibitorów, jak i katalizatorów biologicznych opiera się obecnie na wprowadzaniu stopniowych zmian struktury substancji wiodącej lub wyjściowego enzymu. W obydwu przypadkach, najważniejsze jest określenie *względnych* zmian w naturze oddziaływania z oryginalnym i zmodyfikowanym ligandem (lub enzymem). Wówczas, ze względu na zamrożenie większości stopni swobody inhibitora, substratu czy też stanu przejściowego dzięki wiązaniu z enzymem, różnice entropii stają się mniej istotne w porównaniu ze zmianami $\Delta \mathcal{H}$ [19, 20]. Z powodu względnie ustalonej orientacji reszt polarnych w centrum aktywnym enzymu, zaniedbanie ΔS_{solv} też nie wprowadza znaczących błędów (nie występuje reorganizacja rozpuszczalnika). Pominięcie zmian entropii jest zatem uzasadnione [21], zwłaszcza jeśli zadowala nas otrzymanie względnych wartości stałych inhibicji $\frac{K'_i}{K_i}$ lub stałej katalitycznej $\frac{k'_{cat}}{k_{cat}}$.

Obliczenia wartości energii wiązań niekowalencyjnych są podstawą zarówno do oszacowań wartości stałych inhibicji, jak i stałych katalitycznych (przez różnice w oddziaływaniach z reagentami i ze stanem przejściowym). Zastosowane w opisywanych badaniach techniki zostały szczegółowo opisane w rozdziale 2; natomiast teoretycznym tłem dla dalszych rozważań jest obecny stan wiedzy w zakresie natury oddziaływań.

Przyjmując oszacowanie różnic entalpii swobodnej przez wartość ΔH_{elektr} , można ograniczyć problem natury oddziaływań katalitycznych do podziału na składowe energii oddziaływań w (niezależnym od czasu) ujęciu kwantowochemicznym:

$$\Delta H_{elektr} \approx \Delta E \quad (1.4)$$

Istnieją dwa podstawowe podejścia do teoretycznego opisu oddziaływań, tak zwany model supermolekularny oraz perturbacyjny. W modelu supermolekularnym, energię oddziaływań między cząsteczkami A i B można zapisać jako

$$\Delta E_{A,B} = E_{A,B} - E_A - E_B \quad (1.5)$$

co jest równoznaczne z przybliżeniem dwuciałowym. Dla kompleksów większej liczby cząsteczek, w analogiczny sposób można wyróżnić człony trój- i N-ciałowe:

$$\Delta E_{A,B,C} = E_{A,B,C} - E_A - E_B - E_C - \Delta E_{A,B} - \Delta E_{B,C} - \Delta E_{A,C} \quad (1.6)$$

Metoda supermolekularna sama w sobie nie oferuje znaczącego wglądu w naturę oddziaływań, jest jednak atrakcyjna jako podstawa wyprowadzenia wariacyjnych metod dekompozycji oraz w przypadkach, gdy interesująca jest sama wartość $\Delta E_{A,B}$. Ponieważ można ją zastosować dla każdej metody obliczeniowej, zachowującej ekstensywność ze względu na rozmiar układu, możliwe jest dobranie poziomu teorii odpowiedniego do potrzeb.

W praktycznych zastosowaniach, ograniczonych skończonym rozmiarem bazy funkcyjnej, bezpośrednio użycie wzoru 1.5 wiąże się z niefizycznym efektem błędu superpozycji bazy (ang. *basis set superposition error*, BSSE). Spowodowany jest on (często znaczącym) obniżeniem energii kompleksu spowodowanym rozszerzeniem przestrzeni funkcji bazy, w porównaniu z monomerami. Błąd ten można wyeliminować [22–25] metodą zaproponowaną przez Boysa i Bernardiego [26] (ang. *counterpoise correction*, CP).

Korekta Boysa i Bernardiego w najprostszym ujęciu polega na obliczeniu wszystkich wyrazów z równania 1.5 w bazie dimeru (D):

$$\Delta E_{A,B}(D) = E_{A,B}(D) - E_A(D) - E_B(D) \quad (1.7)$$

Metoda CP była krytykowana z powodu sugerowanej nadkompensacji BSSE [27, 28], jednak wiele prac dowodzi, że zwykle nie jest to uzasadnione [29–33].

W dotychczasowych badaniach natury oddziaływań, obliczenia składowych prowadzono różnymi metodami opartymi najczęściej na ujęciu supermolekularnym, zwykle przez odpowiednie rozszerzenia techniki pola samouzgodnionego. Prowadziło to do definicji członów zależnej od użytego formalizmu, w szczególności dla rzędów wyższych niż pierwszy. Ponieważ jednak próbowano nadawać wprowadzanym składowym odpowiednią fizyczną interpretację, w literaturze przedmiotu można spotkać podobne nazewnictwo różnie zdefiniowanych efektów.

Pośród powszechnie używanych metod dekompozycji można wymienić schematy Kollmana i Allena [34], Urbana i Hobzy [35], Kitaury i Morokumy [36, 37], Tomasiego [38], Stevensa i Finka [39] i inne. W metodach tych podobnie zdefiniowana jest pierwszorzędowa składowa zwana energią Heitlera-Londona $\Delta E_{A,B}^{HL}$. Odpowiada ona energii oddziaływań niezaburzonych monomerów, i jest w prosty sposób obliczana dla macierzy Hartree-Focka zbudowanej ze wzajemnie zortogonalizowanych wektorów dla monomerów (nieoptymalizowanych dla kompleksu). Nawet ten człon może być różnie obliczany (w bazie dimeru lub monomerów) i ma różne interpretacje, np. Kollman [34] określa ją energią oddziaływań elektrostatycznych. W rzeczywistości, na podstawie rozważań teoretycznych lub używając formalizmu rachunku zaburzeń o adaptowanej symetrii można pokazać, że $\Delta E_{A,B}^{HL}$ (oznaczana również jako $E_{A,B}^{(1)}$) jest sumą pierwszorzędowych składowych oddziaływań elektrostatycznych $E_{el}^{(1)}$ oraz wymiennych $E_{exch}^{(1)}$. Zatem energię oddziaływań w przybliżeniu metody pola samouzgodnionego SCF można bez dalszych uproszczeń zapisać jako

$$\Delta E_{A,B}^{SCF} = E_{el}^{(1)} + E_{exch}^{(1)} + E_{del}^{(R)} \quad (1.8)$$

gdzie ostatnia składowa, zwana energią delokalizacyjną, jest wynikiem relaksacji funkcji falowej kompleksu spowodowanej wzajemnym wpływem monomerów. Jest to zatem suma wszystkich efektów rzędów wyższych niż pierwszy, dostępnych w przybliżeniu metody SCF.

Podział zdefiniowany równaniem (1.8) jest podstawą metody dekompozycji zaproponowanej przez Sokalskiego i Roszaka [7]. Alternatywne schematy podziału rozkładają dalej energię delokalizacji, np. na człony przeniesienia ładunku (ang. *charge transfer*, CT), indukcyjne (IND) etc. [36, 38]. Szczególnie człon CT jest sztucznie wyróżnioną składową energii indukcyjnej, która znika w granicy kompletnej bazy funkcyjnej [40, 41]. Definicje tych dodatkowych składowych są w dużym stopniu arbitralne, zależne od metody dekompozycji i od bazy [40], a ich interpretacja fizyczna jest tylko częściowo zgodna z interpretacją opartą na ściślejszych rozważaniach. Z tych względów, zachowanie podziału (1.8) wydaje się najbardziej uzasadnione.

Jeśli prowadzone badania wymagają uwzględnienia korelacji elektronowej, można w naturalny sposób wydzielić również składową korelacyjną, np.

$$\Delta E_{A,B}^{MP2} = \Delta E_{A,B}^{SCF} + E_{corr}^{(R)}(MP2) \quad (1.9)$$

niezależnie od zastosowanego formalizmu dekompozycji oddziaływań na poziomie metody SCF. Składową $E_{corr}^{(R)}$ można obliczyć jakąkolwiek metodą ekstensywną ze względu na rozmiar układu. Powyżej zdefiniowano ją dla metody Möller-Plesset drugiego rzędu (MP2),

ale dokładniejsze modele mogą wymagać kosztowniejszych metod, jak np. MP4 lub CC (ang. *coupled cluster* — metoda sprzężonych klasterów). Wprawdzie $E_{\text{corr}}^{(\text{R})}$ jest wtedy sumą składników różnego rzędu i różnej natury fizycznej, ale odpowiada kolejnemu stopniowi w hierarchii przybliżeń teoretycznych, co ma większe znaczenie dla budowy uproszczonych modeli oddziaływań. Stosunkowo niewielkim kosztem obliczeniowym, możliwość oszacowania $E_{\text{corr}}^{(\text{R})}$ oferują metody funkcjonału gęstości, spośród których sformułowania uwzględniające dokładną wartość energii wymiennej oraz poprawki gradientowe [42] są uważane za stosunkowo dobrze odtwarzające energie oddziaływań polarnych kompleksów [43–45]. Należy jednak pamiętać, że metody DFT dają jakościowo błędny obraz oddziaływań dyspersyjnych, a konieczne do poprawy tego stanu rzeczy uwzględnienie poprawek nielokalnych [46, 47], chociaż generalnie poprawiające jakość wyników, jest wciąż nie zawsze wystarczające [48]. Dopiero ostatnio pojawiły się propozycje uwzględniające dalekozasięgowe efekty dyspersyjne w przybliżony sposób [49].

Z drugiej strony, obiecujące zalety w supermolekularnych obliczeniach energii oddziaływań wydają się oferować metody uwzględniające korelację, wykraczające poza schemat Hartree-Focka, w których koncepcja lokalnej korelacji została wykorzystana pierwotnie dla zmniejszenia kosztów obliczeniowych [50]. Metody te, jak np. metoda MP2 z lokalizacją (LMP2), dają znaczną redukcję błędu superpozycji bazy [51] oraz możliwość dalszej dekompozycji $E_{\text{corr}}^{(\text{R})}$ na człony pochodzące od różnych wzbudzeń [52].

Z wielu względów, lepszy niż ujęcie supermolekularne wgląd w naturę oddziaływań oferuje formalizm rachunku zaburzeń. Energię oddziaływań układu można wówczas rozpiścić w szereg poprawek coraz wyższego rzędu, z których każdy daje się dalej rozłożyć na człony o łatwej do interpretacji naturze fizycznej. W przypadku badań oddziaływań międzycząsteczkowych, konieczne jest uzupełnienie formalizmu rachunku zaburzeń o antysymetryzację funkcji falowej kompleksu na wszystkich poziomach poprawek, aby uwzględnić nierozróżnialność elektronów należących do różnych monomerów. Uzupełnienie takie rozszerza szereg poprawek perturbacyjnych o składniki o naturze wymiennej. Zaproponowane rozwiązania [53–55] są zwykle wspólnie określane mianem rachunku zaburzeń o adaptowanej symetrii (ang. *symmetry-adapted perturbation theory*, SAPT) [25].

Implementacja SAPT umożliwia uzyskanie dokładnego opisu oddziaływań, ale dla układów co najwyżej kilkuelektronowych — w dodatku spełniających założenie, że oddziaływanie jest względnie słabe. Jednak podstawowa wartość tej teorii leży w ścisłej i jednoznacznej definicji różnych składowych oddziaływań, związanej z odpowiednimi efektami kwantowochemicznymi, co pozwala prawidłowo zinterpretować fizyczną naturę składowych — także uzyskanych innymi metodami. Z tego względu, zastosowana dalej w niniejszej pracy nomenklatura jest odniesiona właśnie do terminologii SAPT.

Perturbacyjne rozwinięcie energii oddziaływań można wyrazić jako sumę składowych coraz wyższego rzędu:

$$\Delta E_{A,B} = E_{A,B}^{(1)} + E_{A,B}^{(2)} + E_{A,B}^{(3)} + \dots \quad (1.10)$$

z których każda może być dalej rozłożona na część polaryzacyjną i wymienną:

$$E_{A,B}^{(n)} = E_{pol}^{(n)} + E_{exch}^{(n)} \quad (1.11)$$

Poprawki wyższych rzędów zależą rekurencyjnie od funkcji falowych niższego rzędu; zatem energia oddziaływań $E_{A,B}^{(1)}$ jest funkcją niezaburzonych funkcji falowych monomerów. Dla obliczeń metodą SCF, $E_{A,B}^{(1)}$ jest równoznaczna z energią Heitlera-Londona $\Delta E_{A,B}^{HL}$.

Ze względu na najbardziej praktyczny sposób implementacji SAPT, oparty na reprezentacji funkcji falowych uzyskanych metodą Hartree-Focka, konieczne jest wprowadzenie formalizmu podwójnego rachunku zaburzeń [54]:

$$(\hat{H}_0 + \kappa \hat{V} + \lambda \hat{W})\psi = E\psi \quad (1.12)$$

gdzie \hat{H}_0 jest sumą antysymetrycznych operatorów $\hat{H}_A^{(0)}$ i $\hat{H}_B^{(0)}$ dla nie oddziałujących cząstek A i B, \hat{V} jest operatorem oddziaływania, a \hat{W} jest odpowiedzialny za opis korelacji elektronowej wewnątrz każdej z cząstek A i B.

Rozwinięcie (1.12) w szereg względem kolejnych potęg κ i λ pozwala rozłożyć energię układu na składniki $E_{A,B}^{(kl)}$, gdzie indeks k oznacza rząd poprawki ze względu na \hat{V} , a l ze względu na \hat{W} . Uwzględnienie wszystkich poprawek opisujących korelację wewnątrzcząsteczkową pozwala zapisać składowe energii oddziaływania kolejnych rzędów (Równ. (1.10)) jako

$$E_{A,B}^{(k)} = \sum_{l=0}^{\infty} \lambda^l E_{A,B}^{(kl)} \quad (1.13)$$

Wyprowadzenie podwójnego rachunku zaburzeń dla monomerów A, B opisanych nieskorelowanymi funkcjami uzyskanymi metodą Hartree-Focka pozwala nadać większości składowych $E_{A,B}^{(kl)}$ niższych rzędów fizyczną interpretację, opartą na charakterze opisywanych efektów (wymiana elektronów, wzbudzenia). W szczególności, dwie pierwsze składowe energii oddziaływań SCF wg wyrażenia (1.8) składające się na energię Heitlera-Londona $\Delta E_{A,B}^{HL}$ odpowiadają w formalizmie SAPT wyrażeniu $E_{A,B}^{(10)}$, rozdzielonemu na część polaryzacyjną

i wymienną (Równ. (1.11)). Składniki wyższego rzędu są trudniejsze w interpretacji [25]; np. $E_{A,B}^{(20)}$ jest interpretowana jako suma udziałów indukcyjnego, indukcyjno-wymiennego, dyspersyjnego i wymiennie-dyspersyjnego, z których na poziomie metody SCF opisywane są tylko pierwsze dwa [25, 56]. Ponieważ jednak $E_{del}^{(R)}$ może zawierać składniki wyższych rzędów, jej interpretacja fizyczna nie jest jednoznaczna, a dalszy podział traci na ogólności. Prawdopodobnie jest to także przyczyną zróżnicowanego nazewnictwa (jako składowej deformacyjnej lub delokalizacyjnej SCF). Ta druga nazwa jest tutaj preferowana, jako że termin „energia deformacyjna” został wcześniej wprowadzony do opisu zmiany energii monomeru przy formowaniu kompleksu [57].

Formalnie uzasadnione i wartościowe z punktu widzenia badań natury oddziaływań jest zachowanie podziału energii oddziaływań pierwszego rzędu na część elektrostatyczną i wymienną. Podział taki nie jest trywialny przy użyciu stosunkowo taniego obliczeniowo podejścia wariacyjnego. Dotychczasowe propozycje [35, 36, 38, 39, 58] rozwiązywały ten problem na różne sposoby (np. obliczając $E_{el}^{(1)}$ przez zaniedbanie międzycząsteczkowego różniczkowego nakładania dla nieortogonalizowanych wektorów monomerów), jednak kosztem nieuwzględnienia [36] lub tylko częściowego uwzględnienia [38, 39, 58] poprawki na błąd superpozycji bazy. Alternatywnie, można obliczyć składową wymienną, korzystając z perturbacyjnej definicji $E_{exch}^{(1)}$ dla macierzy gęstości SCF [59]. Wadą takiego rozwiązania jest wysoki koszt obliczeniowy (formalnie $O(N^5)$), ograniczający praktyczne zastosowania do niewielkich układów.

Pozbawione wymienionych wad [40, 60] jest podejście hybrydowe zaproponowane przez Sokalskiego i Roszaka [7]. W metodzie tej nie składowa wymienna, lecz elektrostatyczna obliczana jest bezpośrednio z wyrażenia zdefiniowanego na gruncie rachunku zaburzeń (Równ. (2.6)). Umożliwia to przeprowadzenie obliczeń konsekwentnie w bazie dimeru (D), zatem z pełną korektą BSSE. Zdefiniowana w formie następującej różnica energia wymienna:

$$E_{EX}^{(1)}(D, D) = E^{(1)}(D) - E_{el}^{(1)}(D) \quad (1.14)$$

ze względu na nakładanie przestrzeni funkcji bazy (dimeru) dla obydwu monomerów, różni się formalnie od definicji pierwszorzędowej wymiany wg rachunku SAPT:

$$E_{EX}^{(1)}(D, D) = E_{exch}^{(1)}(D) + \Delta_M(D) \quad (1.15)$$

o człon zwany wymianą zerowego rzędu Murrela [61]; różnica ta nie jest istotna w praktycznych zastosowaniach [40]. Należy zwrócić uwagę na różnicę w notacji: oznaczenie $E_{exch}^{(1)}$

użyte jest tutaj dla perturbacyjnej definicji pierwszorzędowej energii wymiany. Natomiast $E_{\text{EX}}^{(1)}$ w dalszych rozważaniach będzie używana dla wielkości określonej równaniem (1.14). Podobnie, pozostałe człony zdefiniowane wg metody [7] (w bazie dimeru) oznaczane będą przypisanymi pisanymi wielkimi literami (1.16):

$$\Delta E^{\text{SCF}} = E_{\text{EL}}^{(1)} + E_{\text{EX}}^{(1)} + E_{\text{DEL}}^{(\text{R})} \quad (1.16)$$

Dekompozycja Sokalskiego i Roszaka oferuje następujące zalety:

- pełną korektę błędu superpozycji bazy, dzięki konsekwentnemu użyciu tej samej bazy dla całości kompleksu i dla każdego z monomerów;
- korekta BSSE uwzględniona jest we wszystkich obliczanych składowych, dzięki czemu osiągnięto istotną redukcję zależności wszystkich składowych od bazy;
- atrakcyjnie niski koszt obliczeniowy, skalujący się formalnie jak $O(N^4)$. W praktyce, koszt obliczeniowy dla dużych układów rośnie proporcjonalnie do $N^{2.8} \div N^3$;
- stosunkowo prosty schemat obliczeń pozwala na wykorzystanie techniki bezpośredniej metody SCF (bez składowania całek), umożliwiając prowadzenie obliczeń dla układów molekularnych opisywanych ponad tysiącem orbitali atomowych (ang. *atomic orbitals*, AO). Do chwili obecnej, zapotrzebowanie na pamięć masową dostępnych implementacji metod dekompozycji $\Delta E_{\text{A,B}}$ [62, 63] ograniczało ich zastosowanie do układów o rozmiarze nie przekraczającym 200–300 AO;
- poszczególne składowe definiują stopniowo coraz dokładniejsze modele oddziaływań, zaczynając od multipolowej składowej oddziaływań elektrostatycznych, a kończąc na energii oddziaływań uwzględniającej efekty korelacyjne.

Sumarycznym efektem jest znacznie zwiększona dokładność określenia składowych oddziaływań — porównanie wartości obliczonych tą metodą, wyników otrzymanych metodami Kitaury i Morokumy [36] oraz Tomasiego [38], z dokładnymi wynikami obliczonymi metodą SAPT dla modelowych układów He_2 i $(\text{H}_2\text{O})_2$ [64] wskazują, że dokładność obliczeń składowych energii oddziaływań metodą [7] jest o rząd większa, niż w pozostałych przypadkach (Tabele 1.1, 1.2) [60].

W ostatnim czasie pojawiają się coraz to nowe schematy dekompozycji energii oddziaływań [65–67] oferujące np. możliwość zastosowania do układów z przeniesieniem protonu między oddziałującymi cząsteczkami [65], implementację w formalizmie DFT [66] albo

Tablica 1.1: Porównanie dokładności obliczeń pierwszorzędowych składowych elektrostatycznej i wymiennej uzyskanych różnymi metodami rozkładu energii oddziaływań SCF z wynikami SAPT dla dimeru helu (odl. 5.6 a.u.). Wartości energii oddziaływań podano w cal/mol, a odchylenia od wyników SAPT w nawiasach.

| Metoda | Baza | $E_{el}^{(1)}$ | (błąd) | $E_{exch}^{(1)}$ | (błąd) |
|-----------|----------------|----------------|----------|------------------|----------|
| SAPT [64] | 7s4p4d2f1g1h+b | -3.100 | (0) | +22.358 | (0) |
| SCF [36] | 20s2p | -3.089 | (-0.011) | +22.330 | (+0.028) |
| SCF [38] | 20s2p | -3.089 | (-0.011) | +22.330 | (+0.028) |
| SCF [7] | 20s2p | -3.102 | (+0.002) | +22.359 | (-0.001) |

Tablica 1.2: Porównanie wartości pierwszorzędowych składowych elektrostatycznej i wymiennej ekstrapolowanych do kompletnej bazy funkcyjnej (KBF), z odpowiednimi rezultatami SAPT, dla dimeru wody (odl. 3.0 Å). Wartości energii oddziaływań podano w kcal/mol, a odchylenia od wyników SAPT w nawiasach.

| Metoda | Baza | $E_{el}^{(1)}$ | (błąd) | $E_{exch}^{(1)}$ | (błąd) |
|-----------|------------------|----------------|---------|------------------|---------|
| SAPT [64] | 7s4p3d2f+b | -7.04 | (0) | +5.10 | (0) |
| SCF [36] | ΔE_{KBF} | -6.99 | (-0.05) | +5.51 | (-0.41) |
| SCF [38] | ΔE_{KBF} | -6.99 | (-0.05) | +5.90 | (-0.80) |
| SCF [7] | ΔE_{KBF} | -7.03 | (-0.01) | +5.15 | (-0.05) |

alternatywne sposoby eliminacji BSSE [67]. W odróżnieniu od metod [36] i [38], implementacje takich schematów nie są powszechnie dostępne, co pozostawia otwartą kwestię ich efektywności dla układów o rozmiarach interesujących dla badań oddziaływań w centrach aktywnych enzymów.

1.2 Dotychczasowe poglądy na naturę katalizy i inhibicji enzymatycznej

Dokładne poznanie natury oddziaływań odpowiedzialnych za katalizę i inhibicję enzymatyczną jest przedmiotem dyskusji w literaturze naukowej od wielu lat. Pionierami w tej dziedzinie byli Emil Fischer, pierwszy sugerujący komplementarność centrów aktywnych enzymów do ligandów [68], oraz Linus Pauling, autor koncepcji silnej stabilizacji stanu

przejściowego przez centrum aktywne [69]. Od tego czasu, pojawiało się wiele alternatywnych propozycji jak teoria naprężeń sterycznych [70], optymalnego nałożenia orbitali (ang. *orbital steering*, OS) [71], elektrostatycznego klucza i zamka [72,73], etc. Modele te różnią się składowymi oddziaływaniami uznawanymi za najbardziej istotne dla katalizy, jednak wszystkie oparte są na powszechnie akceptowanym założeniu komplementarności katalizatora i stanu przejściowego (lub inhibitora), preferencyjnym w porównaniu z substratami [74]. Dlatego celowe wydaje się określenie, na początku tej pracy, modelu teoretycznego podziału efektów energetycznych katalizy na składowe o dobrze zdefiniowanej naturze fizykochemicznej. Wprowadzenie takiego modelu umożliwi po pierwsze usystematyzowanie obecnego stanu wiedzy literaturowej, poświęconej znaczeniu i badaniom poszczególnych członów, jak również zdefiniowanie celu przedstawionych badań.

Wyda się, że jedno z bardziej kompletnych rozważań na temat istotności w katalizie czynników o różnej naturze zawarł w swojej książce Warshel [19], dochodząc drogą rozważań jakościowych lub półempirycznych do wniosku o dominującej roli oddziaływań o naturze elektrostatycznej. Koncepcja taka została zaakceptowana mimo braku ścisłego dowodu, uzyskanego drogą całkowicie nieempiryczną. Nowe wyniki badań sugerują, że uznanie niektórych ze skrytykowanych tamże [19] poglądów za całkowicie błędne może być przedwczesne w konkretnym przypadku, i obecnie sam Warshel ostrzega przed pochopną interpretacją wyników obliczeniowych lub eksperymentalnych, bez weryfikacji założeń o naturze oddziaływań [6, 21]. Wnioski opisane w pracy [19] zostały ponownie sformułowane z uwzględnieniem najnowszych doniesień [21, 75]. Ze względu na kompletność wyводу, wydają się być one atrakcyjną podstawą dla przybliżenia współczesnej wiedzy na temat natury oddziaływań katalitycznych w enzymach.

Arieh Warshel rozważa następujące czynniki, które w różnych modelach teoretycznych proponowano jako źródło aktywności katalitycznej enzymów:

- naprężenia steryczne;
- desolvatację reagentów;
- optymalne nakładanie orbitali (OS);
- wiązania wodorowe o niskiej barierze przeniesienia protonu (ang. *low barrier hydrogen bonds*, LBHB);
- efekty dynamiczne;
- zmiany entropii w wyniku wiązania z enzymem, oraz

- oddziaływania elektrostatyczne w preorientowanym, polarnym centrum aktywnym.

Wymuszenie przez enzym odpowiednich naprężeń sterycznych w cząsteczce substratu było jedną z pierwszych propozycji wyjaśnień katalizy enzymatycznej. Koncepcja taka była sugerowana już przez Paulinga, który próbował wyjaśnić efektywność katalityczną enzymów na gruncie stabilizacji kompleksu aktywnego [69], i wykorzystana dla wyjaśnienia mechanizmu katalitycznego lizozymu [70]. Podobnie jak wiele innych wczesnych koncepcji natury katalizy enzymatycznej [76, 77], które oparte były na rozważaniach teoretycznych lub wynikach eksperymentalnych dla reakcji w układach modelowych, nie mogły one zostać zweryfikowane na poziomie mikroskopowym z braku odpowiednich narzędzi i mocy obliczeniowej. Koncepcja wywierania przez enzym nacisku sterycznego deformującego konformację substratu w kierunku konformacji stanu przejściowego została generalnie odrzucona na podstawie badań metodami MD, które ujawniły znaczną płynność struktur białkowych [78]. Wprawdzie wprowadzając steryczne modyfikacje centrum aktywnego łatwo jest zniszczyć aktywność katalityczną enzymu [19], ale jest to tylko argument ukazujący istotność geometrycznej komplementarności centrum aktywnego do ligandów. W tym sensie, steryczne dopasowanie enzymu jest niezbędnym warunkiem jego efektywności, jednak nie przez obniżenie bariery aktywacji, lecz przez zapewnienie optimum oddziaływań. Za wyjątkiem reakcji, w których przemieszczenia atomów między substratami i stanem przejściowym są bardzo duże, jest mało prawdopodobne, aby nacisk mechaniczny wywierany przez enzym był istotnym elementem katalizy.

Wniosek ten [19] wymaga ponownego rozpatrzenia w kontekście współczesnej teorii kinetycznej Marcusa [79, 80], wg której podstawową siłą napędową reakcji w fazach skondensowanych są fluktuacje otoczenia. Jest możliwe, że kolektywne ruchy masywnych domen białkowych mogą dostarczyć *chwilowo* stosunkowo dużego wkładu energetycznego. Warshel dyskutuje zbliżoną propozycję pod nazwą *dynamicznych efektów katalitycznych*, polegającą na wykorzystaniu przez enzym fluktuacji niedostępnych dla reagentów w roztworze. Wprawdzie zostaje ona również uznana za mało prawdopodobną — i raczej należy się z tym zgodzić w ogólnym przypadku — jednak możliwość taka powinna być nadal brana pod uwagę dla enzymów o budowie domenowej, gdy centrum aktywne znajduje się na powierzchni kontaktowej domen lub podjednostek. Efekty tego typu są nadal trudne w modelowaniu ze względu na dużą skalę czasową takich kolektywnych ruchów. Ponadto, ze względu na możliwą kompensację znacznego wkładu energetycznego małym prawdopodobieństwem zajścia odpowiedniej fluktuacji, trudno jest ocenić sumaryczny efekt na ΔG^\ddagger . W najnowszych pracach sugerowane jest niekiedy znaczenie kompresji reagentów dla obniżenia bariery aktywacji reakcji [81].

W niektórych reakcjach (np. S_N2) sugerowano istotną rolę niepolarnego centrum aktywnego, na podstawie obserwowanego przyspieszenia reakcji modelowych w rozpuszczalnikach niepolarnych. Hipoteza ta została wykluczona [19, 21, 75] na podstawie obserwacji, że za zysk przeprowadzenia reakcji w niepolarnym enzymie trzeba zapłacić znaczną stratą energii solwatacji; korzystniejszy energetycznie cykl termodynamiczny daje się zbudować przy założeniu komplementarnej do substratów polarności centrum aktywnego [19, 82].

Desolvatacja reagentów jest przykładem bardziej ogólnej koncepcji obniżania bariery aktywacji dzięki destabilizacji przez enzym kompleksu substratów (ang. *ground state destabilization*, GSD). Na bazie koncepcji GSD, często sugerowanym wyjaśnieniem mechanizmu katalizy enzymatycznej jest wybiórcze wiązanie przez enzym mniej stabilnego konformeru kompleksu substratów, bliskiego konformacji stanu przejściowego (ang. *near attack conformer*, NAC). Mimo że w niektórych przypadkach może być to optymalnym rozwiązaniem, generalnie enzymy ewoluują w kierunku maksymalizacji całkowitej wydajności katalitycznej, proporcjonalnej do $\frac{k_{cat}}{K_m}$. Ponieważ destabilizacja kompleksu substratów odbywa się kosztem ΔG wiązania substratów (K_m), koncepcja GSD nie wydaje się być wystarczająco ogólną [75, 77].

Hipoteza dużego znaczenia katalitycznego wiązań wodorowych o niskiej barierze przeniesienia protonu (LBHB) była przedmiotem gorącej dyskusji, zyskując wiele głosów poparcia oraz krytyki [83, 84]. Warshel [21] uznaje ją wprawdzie za niewystarczająco uzasadnioną, ale niewykluczoną. W rzeczywistości, obecność LBHB została w wielu przypadkach wykazana drogą obliczeń, np. [85], lub doświadczalnie [86].

Znacznie trudniejszymi do oszacowania, a zwłaszcza do uogólnienia, są efekty związane ze zmianami entropii na ścieżce reakcji [20, 21]. Wprawdzie (tylko ogólnie) niektóre z nich można uznać za mało istotne (jak wiązanie NAC), ale należy się liczyć z koniecznością oceny ich jakościowego udziału w konkretnych przypadkach. Wprawdzie niektóre propozycje uzasadniane na gruncie korzystnych zmian entropii — jak hipoteza OS [71] zostały skrytykowane ze względu na niezbyt realistyczne założenia (koncepcja OS sugeruje dużą stromość PES w funkcji geometrii, co wymagałoby znacznej precyzji w ułożeniu reagentów dla zajścia reakcji) [21, 87], ale w niektórych przypadkach również doczekały się potwierdzenia eksperymentalnego [88].

Obliczenia zmian entropii są wciąż stosunkowo kosztowne i wymagają bardzo uproszczonych funkcji potencjału; konsekwentnie, liczba prac oceniających efekt katalityczny $T\Delta S^\ddagger$ jest niewielka. Znane są jednak doniesienia zarówno o znacznych, jak i znikomych udziałach entropowych, nawet dla bardzo zbliżonych enzymów [20, 89, 90].

Oczywiście trudno oczekiwać, że uogólnione rozumienie natury katalitycznej katalizatorów enzymatycznych będzie jednakowo słuszne w każdym przypadku. Uogólnienia są

przede wszystkim potrzebne dla budowy uproszczonych modeli zjawisk. Wielostronne potwierdzenie w ostatnim dziesięcioleciu [91–95] znalazł wniosek o dominującej w katalizie roli elektrostatycznej stabilizacji stanu przejściowego, sformułowany w książce [19] i przez innych autorów [77, 96]. Náray–Szabó [73] przypomniał nawet — w kontekście oddziaływań elektrostatycznych — tezę komplementarności enzymu i ligandu, zaproponowaną wiek temu przez Fischera [68]. Fakt lepszego wiązania przez enzym stanu przejściowego niż substratów znajduje jednocześnie zastosowanie i potwierdzenie w projektowaniu inhibitorów jako analogów stanu przejściowego oraz syntezie nowych katalizatorów przez imprinting takich analogów w stałych matrycach [97] lub immunizację nimi organizmów wyższych (powodując biosyntezę katalitycznych przeciwciał, tzw. abzymów) [98]. Elektrostatyczna komplementarność centrum aktywnego do wiązanych ligandów była szczegółowo studiowana przez Chau i Deana [74].

1.3 Przybliżone modele oddziaływań

Problemowi konstrukcji przybliżonych modeli oddziaływań elektrostatycznych poświęcono wiele uwagi ze względu na znaczne zapotrzebowanie na przybliżone funkcje oddziaływań, niezbędne dla modelowania makrocząsteczek. Najbardziej uproszczone modele przybliżają $E_{\text{EL}}^{(1)}$ kulombowskim oddziaływaniem atomowych ładunków cząstkowych i stanowią podstawę większości dostępnych współcześnie pól siłowych [99–101]. Ładunek atomu w cząsteczce nie jest jednak wielkością obserwowalną, co nastęrcza problemy natury teoretycznej oraz praktycznej wiążące się z jego obliczeniem; m.in. możliwych jest nieskończenie wiele arbitralnych definicji analizy populacyjnej (por. Równ. (2.10)). Efektem jest m.in. znaczna zależność ładunków uzyskanych metodami analizy populacyjnej od metody, bazy funkcyjnej, konformacji etc. oraz generalnie nie najlepsza jakość opisu oddziaływań i właściwości elektrostatycznych cząsteczek.

Formalnie elegancką metodę obliczania ładunków atomowych, opartą na podziale gęstości elektronowej (wielkości obserwowalnej) zaproponował Bader (ang. *atoms in molecules*, AIM) [102]. Ładunki otrzymane metodą AIM są wprawdzie stosunkowo przenośne [103], ale ze względu na zbyt duże wartości bezwzględne niezbyt dobrze odtwarzają molekularny potencjał elektrostatyczny (ang. *molecular electrostatic potential*, MEP) oraz energie oddziaływań, i z tego względu raczej nie znajdują zastosowania w konstrukcji FF. Proponowano także inne modele oparte na podziale gęstości elektronowej. Warta wspomnienia jest metoda którą zaproponował Mezey, pozwalająca budować molekularną gęstość elektronową z przenośnych fragmentów [104, 105]. Nie znalazła ona jednak zastosowania w badaniach oddziaływań, a jedynie posłużyła jako miara podobieństwa cząsteczek [106].

Znacznie szersze zastosowanie znalazły metody obliczania ładunków atomowych najlepiej — w sensie średniego odchylenia kwadratowego — odtwarzających inną wielkość obserwowalną, potencjał elektrostatyczny (ang. *potential derived charges*, PDC) [107–109]. Ostatnie dziesięciolecie przyniosło stosunkowo duże polepszenie jakości tego typu modeli, przez redukcję zależności ładunków od wyboru siatki potencjału [110,111] oraz statystycznego niedookreślenia ładunków atomów zagnieżdżonych [112]. Postęp w tym zakresie przyniosło zastosowanie w procedurze statystycznego dopasowania dodatkowych wiązań [109]; dodatkowo, umożliwiło to wymuszenie większej przenośności otrzymanych ładunków między różnymi konformacjami lub nawet cząsteczkami [113]. Przegląd zalet i wad ładunków PDC został ostatnio opublikowany w czternastym woluminie serii „Reviews in Computational Chemistry” [114].

Jedną z przyczyn niezadowalającej jakości różnych przybliżonych modeli MEP i oddziaływań elektrostatycznych jest nieuwzględnienie opisu wyższego rzędu efektów polaryzacyjnych. Zastosowanie obliczonych nieempirycznie polaryzowalności atomowych nie okazało się praktyczne, ze względu na ich tensorowy charakter, nieaddytywność oraz zależność od orientacji i konformacji cząsteczki. Podejmowano różne próby stworzenia empirycznego modelu polaryzowalności [115–117]; najwięcej nadziei, ze względu na formalne uzasadnienie na gruncie teorii funkcjonału gęstości, wiązanych jest obecnie z modelem równoważenia potencjału chemicznego (ang. *chemical potential equalization*, CPE) [117]. Ilościowa ocena udziału energii polaryzacji, będącej sumą udziałów indukcyjnych i indukcyjno-wymiennych różnych rzędów, wymagałaby jednak obliczeń zbyt kosztownych dla dużych układów i wykracza poza zakres tej pracy.

Dokładność modeli opartych na ładunkach atomowych jest ponadto ograniczona niedostatecznym opisem anizotropii rozkładu ładunku. Niedoskonałość modeli uwzględniających tylko ładunki atomowe może być powodem niedokładnego odtwarzania energii oddziaływań, konformacji kompleksów molekularnych [118,119] oraz MEP [120]; dla poprawy jakości modelu konieczny jest bardziej szczegółowy opis rozkładu ładunku.

1.3.1 Wielocentrowe rozwinięcia multipolowe

Wiele niedoskonałości modeli opisu molekularnego rozkładu ładunku przez punktowe ładunki atomowe można wyeliminować przez ich uzupełnienie o wyższe momenty elektrostatyczne. Pozwala to poprawić dokładność i anizotropię opisu rozkładu ładunku [121–123], oraz zniwelować arbitralny charakter różnych definicji ładunku atomowego [124]. Pokazano nawet, że dla wystarczająco długich wiązań kowalencyjnych model oparty na atomowych momentach multipolowych [123] wystarcza do opisu bariery rotacji wokół wiąza-

nia [60, 125, 126].

Porównując energię oddziaływań elektrostatycznych multipolowej reprezentacji molekularnego rozkładu ładunku $E_{\text{EL,MTP}}^{(1)}$ z nieempiryczną składową $E_{\text{EL}}^{(1)}$ można pokazać, że w granicy pełnego rozwinięcia szeregu multipolowego $E_{\text{EL}}^{(1)}$ jest sumą oddziaływań multipolowych oraz składowej penetracyjnej:

$$E_{\text{EL}}^{(1)} = E_{\text{EL,MTP}}^{(1)} + E_{\text{EL,PEN}}^{(1)} \quad (1.17)$$

przy czym dokładność przybliżenia $E_{\text{EL,MTP}}^{(1)}$ można dobrać w sposób praktycznie dowolny; w ten sposób, możliwa jest dokładna ocena jakości niezbędnego w danym przypadku przybliżenia.

Spośród kilku propozycji uzupełnienia analizy populacyjnej o elektrostatyczne momenty multipolowe rzędu wyższego niż zerowy, największą popularnością cieszą się obecnie: metoda rozproszonej analizy momentów multipolowych (ang. *distributed multipole analysis*, DMA) [122] oraz różne warianty metody CAMM (ang. *cumulative atomic multipole moments*) [121, 123]. Metoda DMA, zawdzięczająca popularność powszechnie dostępnej implementacji [62, 63], wykorzystuje własności funkcji Gaussa, najczęściej używanych do przybliżenia molekularnych funkcji falowych. Najbardziej korzystne rozwinięcie szeregu DMA na centrach wszystkich par orbitali Gaussa jest jednak niezbyt praktyczne, dlatego zaproponowany przez autora metody DMA kompromis sugeruje centrowanie szeregu na jądrach atomowych oraz w połowie długości wiązań [122]. Wiąże się to z utratą skończonej zbieżności szeregu i powoduje, że DMA staje się numerycznie równoważne innym nieskończonym rozwinięciom [127].

Alternatywne sformułowanie analizy multipolowej CAMM (lub CMMM, przy wykorzystaniu pozaatomowych centrów rozwinięcia, [123, 128]) ma tę zaletę, że momenty multipolowe coraz wyższych rzędów opisują tylko anizotropię ładunku nie uwzględnioną na niższym poziomie rozwinięcia. Zapewnia to jednocześnie zbieżność szeregu multipolowego oraz pozwala traktować CAMM/CMMM jako rekurencyjne uzupełnienie dowolnie zdefiniowanych ładunków atomowych [124], a co za tym idzie, lepiej nadaje się do systematycznej analizy hierarchii przybliżeń o różnej dokładności (por. Równ. (2.9)). Analiza CAMM, w przeciwieństwie do DMA, nie jest też ograniczona do gaussowskich baz funkcyjnych.

Oprócz multipolowych wariantów analiz populacyjnych, sporo uwagi poświęcono w ostatnich latach możliwości uzyskania opisu wielocentrowym rozwinięciem multipolowym doświadczalnych gęstości elektronowych, mierzonych metodą wysokorozdzielczej dyfrakcji promieni Röntgena [129, 130]. Uzyskane w ten sposób atomowe rozwinięcia multipolowe są, jak twierdzą autorzy, w dużym stopniu przenośne [131], także dla polipeptydów [132].

Należy zauważyć, że największa dokładność pomiaru gęstości elektronowej osiągana jest dla zrębów atomowych, a nie dla (najistotniejszych dla oddziaływań) powłok walencyjnych. Ponadto pomiary te odnoszą się do cząsteczek w polu krystalicznym, a nie w fazie gazowej lub w otoczeniu rozpuszczalnika.

Ważną zaletą modeli multipolowych jest fakt, że mogą być użyte w metodach hybrydowych QM/MM do opisu oddziaływania otoczenia na część układu opisywaną metodą *ab initio* [133]. Z możliwości tej skorzystano w implementacji metody efektywnego potencjału fragmentów (ang. *effective fragment potential*, EFP) [14], wykorzystującej wielocentrowe momenty multipolowe uzyskane metodą DMA. Dokładność metody EFP została zweryfikowana na przykładzie obliczeń efektów solwatacyjnych [134]. Użyto jej również do modelowania środowiska centrum aktywnego reakcji przeprowadzanej przez rybonukleazę A [1]. Metoda EFP, mimo że nie dorównuje ogólnością innym implementacjom QM/MM (np. [13]), oferuje znacznie większą dokładność modelowania otoczenia reakcji niż metody oparte na przybliżeniu FF, nadając się szczególnie dobrze do opisu preorientowanego, polarnego charakteru centrum aktywnego zapewnianego przez reszty nie biorące bezpośrednio udziału w reakcji. Dokładność ta jest efektem szczegółowego opisu rozkładu ładunku w rozwinięciu DMA, parametrycznemu przybliżeniu oddziaływań wymiennych i polaryzowalności; z drugiej strony, brak jest niefizycznych efektów wynikających z różnic opisu funkcji falowej na granicy warstw QM/MM, na które łatwo narazić się przy nieostrożnym stosowaniu np. metody ONIOM (ang. *Our own N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics approach*) [13].

1.3.2 Hierarchia modeli teoretycznych

Niewielki koszt obliczeniowy modeli elektrostatycznych oraz duża liczba doniesień potwierdzających znaczący udział oddziaływań tego rodzaju w katalizie i inhibicji nie powinny zastępować szczegółowej analizy oddziaływań w określonym przypadku, gdyż łatwo jest przekroczyć zakres stosowalności takich modeli [6,135]. W wielu sytuacjach, możliwość wykorzystania niekosztownego modelu jest bardzo atrakcyjna nawet, jeśli wiąże się z dużym ryzykiem — przykładem może być potrzeba wyboru spośród dziesiątek możliwości odpowiedniego wstępnego stanu protonacji układu lub ekstrapolacji wniosków dotyczących roli katalitycznej niektórych reszt [135].

Na odległościach kontaktowych, oddziaływania międzycząsteczkowe są wynikiem subtelnej równowagi składowych o różnej naturze, zmieniającej się wraz z odległością. Dla niektórych przypadków, żadna ze składowych nie może zostać zaniedbana [135], ale dla innych okazuje się, że nawet dla bardzo małych odległościach można osiągnąć wartościowe,

często pólnościowe wyniki używając przybliżonych modeli [136]. Dlatego analiza istotności różnych składowych energii oddziaływań powinna wiązać się z dobrze określoną hierarchią przybliżeń, aby możliwe było optymalne dobranie odpowiedniego dla problemu poziomu teorii, na podstawie kompromisu między kosztem a dokładnością. Takie podejście przyjęto w tej pracy; wybrana metoda analizy oddziaływań, opisana wcześniej, pozwala zdefiniować hierarchię modeli teoretycznych o stopniowo malejącej precyzji i koszcie obliczeniowym (podanym po lewej; N oznacza liczbę orbitali atomowych, A liczbę atomów):

$$\begin{aligned}
\Delta E = & E_{\text{EL,MTP}}^{(1)} + E_{\text{EL,PEN}}^{(1)} + E_{\text{EX}}^{(1)} + E_{\text{DEL}}^{(R)} + E_{\text{corr}}^{(R)} \\
O(N^5) & \underbrace{\hspace{10em}}_{\Delta E^{\text{MP2}}} \\
O(N^4) & \underbrace{\hspace{10em}}_{\Delta E^{\text{SCF}}} \\
O(N^4) & \underbrace{\hspace{10em}}_{E^{(1)}} \\
O(N^4) & \underbrace{\hspace{10em}}_{E_{\text{EL}}^{(1)}} \\
O(A^2) & \underbrace{\hspace{10em}}_{E_{\text{CMM}}^{(1)}}
\end{aligned} \tag{1.18}$$

Dalsze uproszczenie modelu oddziaływań możliwe jest przez odrzucenie najmniej istotnych wyrazów rozwinięcia $E_{\text{EL,MTP}}^{(1)}$; często spotykanym jest zakończenie szeregu multipolowego na wyrazach o tej samej zależności od odległości (ang. *exponent truncated series*, ET). Sposób ten przyjęto także i w tej pracy (Równ. (1.19)).

$$E_{\text{EL,MTP}}^{(1)} = \underbrace{E_{q-q}^{(1)}}_{\sim R^{-1}} + \underbrace{E_{q-\bar{\mu}}}_{\sim R^{-2}} + \underbrace{E_{q-\bar{\Theta}} + E_{\bar{\mu}-\bar{\mu}}}_{\sim R^{-3}} + \underbrace{E_{q-\bar{\Omega}} + E_{\bar{\mu}-\bar{\Theta}}}_{\sim R^{-4}} + \dots \tag{1.19}$$

Proponowana hierarchia modeli oddziaływań pokrywa systematycznie zakres przybliżeń energii oddziaływań od opartego na ładunkach punktowych ($E_{q-q}^{(1)}$) aż do nieempirycznego modelu uwzględniającego korelację elektronową. Analiza stopnia dokładności przybliżenia na wszystkich jej poziomach jest zatem jednocześnie praktycznym sposobem doboru optymalnego poziomu teoretycznego dla badanego problemu.

1.4 Cele badań

W pierwszym rzędzie, postanowiono wykonać jedną z pierwszych nieempirycznych analiz natury oddziaływań w centrach aktywnych szeregu enzymów. Szczegółowe badania w tym zakresie, przedstawione w rozdziale 3, miały na celu weryfikację zasadności powszechnie przyjmowanego założenia o dominującej roli oddziaływań elektrostatycznych oraz możliwie dokładne określenie zakresu jego stosowalności.

W zakresie stosowalności elektrostatycznego przybliżenia energii oddziaływań, postanowiono sobie za cel porównanie dostępnych modeli przybliżonych oraz identyfikację problemów stojących na drodze do konstrukcji dokładniejszych metod parametrycznego opisu rozkładu ładunku i oddziaływań międzycząsteczkowych. W szczególności, postanowiono skompletować pełną bibliotekę skorelowanych atomowych momentów multipolowych dla wszystkich form protonacji naturalnych aminokwasów, zbadać jakość uzyskiwanych wyników w porównaniu z innymi modelami oraz zbadać w sposób ilościowy przenośność konformacyjną i międzycząsteczkową elementów biblioteki, analizując główne przyczyny błędów. Badaniom w tym zakresie poświęcono rozdział 4.

W oparciu o dostępne wyniki pomiarów wielkości fizycznych wynikających z oddziaływań międzycząsteczkowych (zmiany stałych kwasowości, stałe inhibicji itp.), postanowiono wykonać analizę fizycznej natury oddziaływań oraz ocenić przydatność nieempirycznej metody podziału energii oddziaływań opisanej w tym rozdziale [7] dla doboru optymalnej dla określonego problemu metody badań, stosownie do hierarchii przybliżeń zdefiniowanej równaniami (1.18) i (1.19). Uzyskane wyniki opisano w rozdziałach 5.1 i 5.2.

Opierając się na współczesnych poglądach na naturę katalizy enzymatycznej, sugerujących dominującą rolę elektrostatycznej stabilizacji przez centrum aktywne stanu przejściowego [19, 21, 75, 137, 187], postanowiono także określić drogą teoretyczną, w grupach spokrewnionych ze sobą enzymów, reszty aminokwasowe o największej aktywności katalitycznej. Tematowi temu poświęcono rozdział 5.3.

Rozdział 2

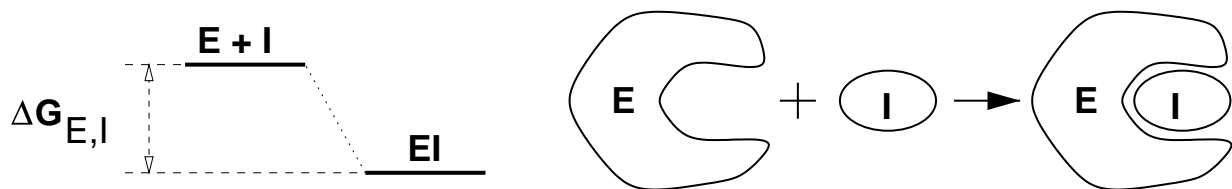
Metody obliczeniowe

2.1 Badane efekty różnicowe

Energia oddziaływania enzym-ligand jest wielkością niezbędną dla przewidywania katalitycznych własności układów enzymatycznych oraz wiązania ligandów. Nawet dla wielkości silnie zależnych od zmian entropii, takich jak eksperymentalne stałe wiązania czy inhibicji, wyłącznie entalpowe czy nawet elektronowe przybliżenie energii oddziaływań ma znaczące zastosowanie w podejściu perturbacyjnym, tj. przy założeniu niezmienności pozostałych członów $\Delta G_{A,B}$ oddziaływania (i konsekwentnie wykonaniu obliczeń dla statycznych struktur). Metodyka taka jest powszechnie stosowana w literaturze ze względu na wciąż nieosiągalnie wysoki koszt pełnych obliczeń różnic energii swobodnej, ewentualnie w połączeniu z oszacowaniem efektów entropowych metodami empirycznymi.

Należy przy tym zauważyć, że niezależnie od zastosowania — w obliczeniach statycznych dla izolowanych cząsteczek, w dynamice kwantowej czy w metodach hybrydowych QM/MM — korzystamy z równania Schrödingera niezależnego od czasu, w przybliżeniu Borna-Oppenheimera. Analiza członów energetycznych w przybliżeniu statycznym jest zatem tak samo istotna dla statycznych i dynamicznych obliczeń. Ponadto, jak wynika z dyskusji przeprowadzonej w poprzednim rozdziale, w wielu interesujących przypadkach można wprowadzić przybliżenia prowadzące do znikania większości nieelektronowych składników energii oddziaływań. Z tego względu, jak również dla zastosowań do budowy efektywniejszych empirycznych modeli oddziaływań, analiza natury składowej elektronowej energii oddziaływań jest bardzo ważna i może znaleźć wielostronne zastosowania.

W szczególności, należy wymienić te zastosowania, które są z dobrym przybliżeniem opisywane przez człon ΔE w równaniu (1.2), albo ze względu na spełnienie warunków znikania innych wyrazów, albo w dla celów względnych porównań podobnych układów.



Rysunek 2.1: Model inhibicji enzymatycznej.

Poniżej zaprezentowano kilka przykładów zastosowań modelowania inhibicji i katalizy enzymatycznej, które były przedmiotem studiów w dalszej części tej pracy.

2.1.1 Stałe wiązania i inhibicji

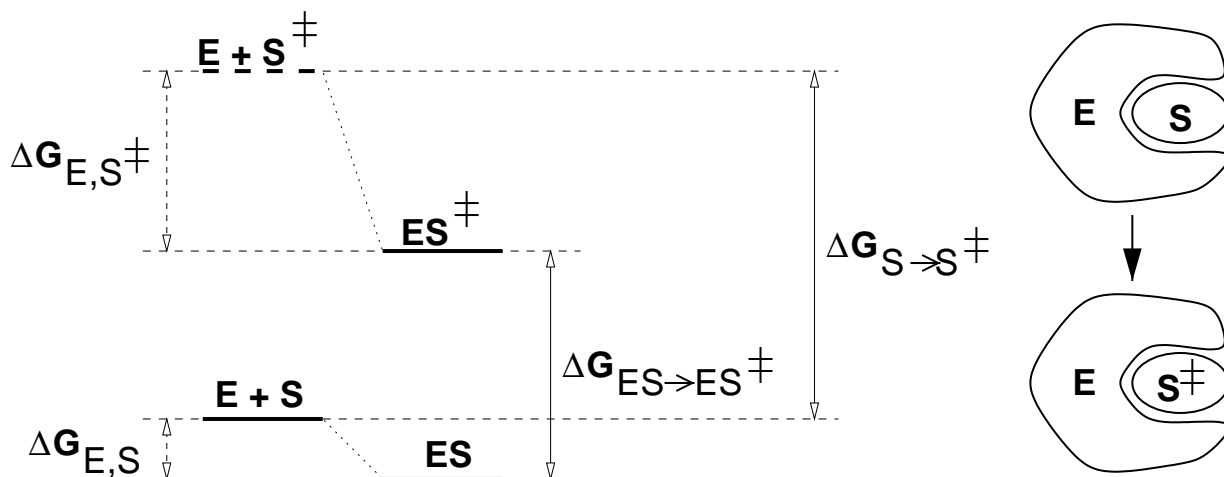
Jest to przypadek, gdzie różnica entropii między stanem wolnym a związanym ligandu nie może być formalnie pominięta. Jednakże porównanie oddziaływań różnych ligandów (I, I') z tym samym centrum aktywnym (lub tego samego ligandu z różnymi wariantami centrum katalitycznego) niesie wystarczająco dużo informacji przydatnych do przewidywania efektów modyfikacji. Takie porównawcze obliczenia można wykonać w fazie gazowej (Rys. 2.1, Równ. (2.1)), gdzie różnica energii między kompleksami (E+I) a (E+I') jest równa w przybliżeniu różnicy energii elektronowej I i I'.

$$\Delta G_{E,I} = -RT \ln K_i \quad (2.1)$$

Możliwe jest wówczas zbadanie korelacji wyników teoretycznych i eksperymentalnych (patrz rozdział 5.2). Bezpośrednie porównanie z doświadczeniem wymaga jednak albo uzasadnienia założenia, że energia swobodna obydwu wariantów w roztworze jest porównywalna, albo oszacowania tych różnic inną metodą, np. zaburzenia energii swobodnej (ang. *free energy perturbation*, FEP).

2.1.2 Analiza katalitycznej roli elementów centrum aktywnego

O ile modelowanie wielkości bezpośrednio zależnych od entalpii swobodnej wymaga dużej ostrożności, o tyle wiele efektów o naturze różnicowej daje się dość dokładnie przybliżyć różnicą członów elektronowych. Przykładowo, reakcja zachodząca w centrum aktywnym enzymu zwykle z dobrym przybliżeniem spełnia założenia rachunku zaburzeń, a oddziałujące układy są względem siebie unieruchomione (Rys. 2.2). W takim przypadku można przyjąć, że różnica entalpii swobodnych wiązania stanu przejściowego i substratu jest bliska odpowiedniej różnicy elektronowych energii oddziaływań (Równ. (2.2)). W użytej notacji,



Rysunek 2.2: Ilustracja stabilizacji stanu przejściowego w katalizie enzymatycznej.

wielkość tę nazwano energią różnicowej stabilizacji stanu przejściowego (ang. *differential transition state stabilization*), Δ^{DTSS} [60, 137].

$$\Delta^{\text{DTSS}} = \Delta G_{E,S^\ddagger} - \Delta G_{E,S} \approx \Delta E_{E,S^\ddagger} - \Delta E_{E,S} \sim -RT \ln k_{\text{cat}} \quad (2.2)$$

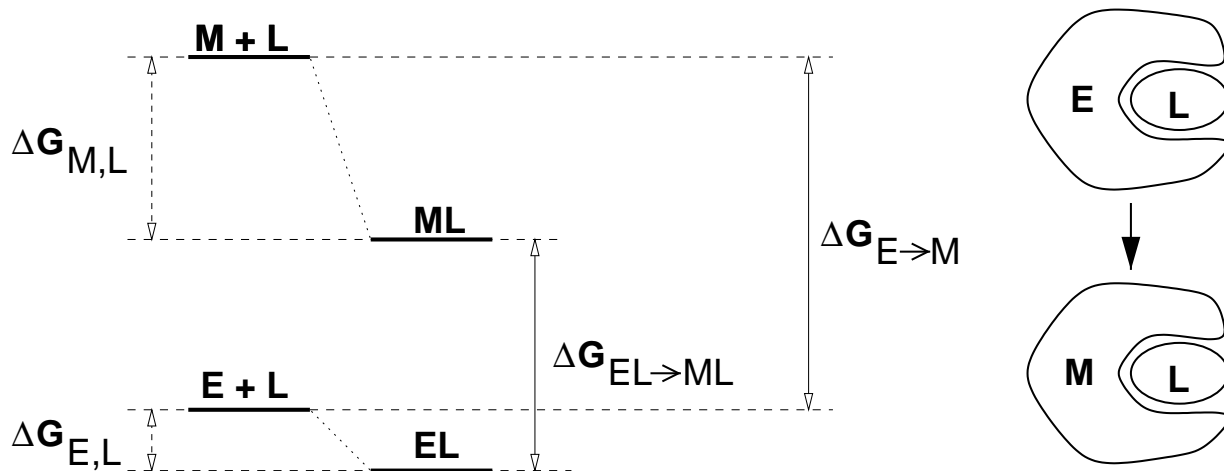
2.1.3 Wpływ mutacji na zmiany pK_a aminokwasów

Jeżeli odwrócimy sytuację z rysunku 2.2, możemy rozszerzyć użyty formalizm na całą klasę innych praktycznych zastosowań. Rysunek 2.3 obrazuje sytuację, gdy zmiany są wprowadzone w obrębie enzymu (E – enzym w formie wyjściowej, M – enzym zmodyfikowany). Jest to tylko zabieg formalny umożliwiający zapis równania analogicznego do (2.2), pozwalający na przewidywanie efektów mutacji i badanie ich natury (Równ. (2.3)).

$$\Delta_{E \rightarrow M}^{\text{DEM}} = \Delta G_{M,L} - \Delta G_{E,L} \approx \Delta E_{M,L} - \Delta E_{E,L} \quad (2.3)$$

Równanie (2.3), definiujące efekt energetyczny różnicowego efektu modyfikacji (ang. *differential effect of modification*, DEM), można ponadto zinterpretować na kilka innych sposobów. Przypuśćmy, że jako związany ligand potraktujemy wybraną resztę (R), która może ulegać protonacji ($R^0 \rightarrow R^+$). Wówczas różnicowy efekt mutacji Δ^{DEM} na stabilizację form R^0 i R^+ odpowiada zmianie stałej kwasowości reszty R, wywołanej daną mutacją (Równ. (2.4)).

$$\Delta^{\text{DEM}}(R^+) - \Delta^{\text{DEM}}(R^0) = -2.303RT \Delta \text{pK}_a \quad (2.4)$$



Rysunek 2.3: Ilustracja wpływu modyfikacji enzymu (np. mutacji) na wiązanie ligandu.

Podobnie, traktując jako ligand substrat (S) oraz stan przejściowy (S^\ddagger), w ten sam sposób można obliczyć wpływ mutacji na szybkość reakcji katalizowanej przez enzym (Równ. (2.5)). W tym wypadku, niezbędne jest spełnianie przez enzym założeń modelu Michaelis-Menten [138] — wtedy stała katalityczna k_{cat} odpowiada przejściu bariery energetycznej $S \rightarrow S^\ddagger$.

$$\Delta^{\text{DEM}}(S^\ddagger) - \Delta^{\text{DEM}}(S) \sim -RT \ln \frac{k_{cat}(M)}{k_{cat}(E)} \quad (2.5)$$

2.2 Nieempiryczna analiza natury oddziaływań

Podstawą przeprowadzonych analiz natury oddziaływań oraz efektów różnicowych w wybranych układach enzymatycznych był podział energii oddziaływań zdefiniowany równaniem (1.16), przybliżając zmiany entalpii swobodnej odpowiednimi zmianami energii oddziaływań uzyskanymi w przybliżeniu metody pola samouzgodnionego SCF lub metodą MP2. Stosownie do dyskusji przeprowadzonej we *Wstępie*, taki wybór podyktowany jest optymalnym kompromisem między wymaganą precyzją modelu a kosztem obliczeniowym. Zalety takie oferuje opracowana i zaimplementowana w naszym zespole metoda dekompozycji, oparta na zdefiniowanym na podstawie rachunku zaburzeń wyrażeniu na energię elektrostatyczną oddziaływań pierwszego rzędu ($E_{pol}^{(10)}$ w notacji SAPT — Równ. (1.10), (1.11), patrz komentarz tamże):

$$\begin{aligned}
E_{\text{EL}}^{(1)}(D) &= \sum_r \sum_s \sum_t \sum_u P_{rs}^{\text{A}}(D) P_{rs}^{\text{B}}(D) \langle rs | R_{12}^{-1} | tu \rangle \\
&+ \sum_r \sum_s \sum_b P_{rs}^{\text{A}}(D) \langle r | -Z_b R_{1b}^{-1} | s \rangle \\
&+ \sum_t \sum_u \sum_d P_{tu}^{\text{B}}(D) \langle t | -Z_a R_{1a}^{-1} | u \rangle \\
&+ \sum_a \sum_b Z_a Z_b R_{ab}^{-1}
\end{aligned} \tag{2.6}$$

gdzie indeksy r, s, t, u odnoszą się do orbitali atomowych dimeru, a i b numerują atomy odpowiednio cząsteczek A i B, a P_{rs}^{A} i P_{rs}^{B} oznaczają elementy odpowiednich macierzy gęstości. Obliczenia w bazie dimeru (D) zapewniają pełną korektę BSSE, a wykorzystanie równania (2.6) pozwala ominąć kosztowną transformację całek stosowaną w perturbacyjnych obliczeniach składowych energii oddziaływań. W połączeniu z implementacją bezpośredniej metody SCF [8] pozwala to na obliczenia dla układów o rozmiarach do ok. 1000 orbitali atomowych. Zalety te zostały podsumowane we *Wstępie*, w porównaniu z innymi dostępnymi metodami.

Pozostałe składowe energii oddziaływań SCF w schemacie [7] zdefiniowane są w formie następujących różnic:

$$E_{\text{EX}}^{(1)} = E^{(1)} - E_{\text{EL}}^{(1)} \tag{2.7}$$

$$E_{\text{DEL}}^{(\text{R})} = \Delta E^{\text{SCF}} - E^{(1)} \tag{2.8}$$

W niektórych przypadkach (rozdział 5.2), określono również względny udział w oddziaływaniu energii korelacji elektronowej, zdefiniowanej równaniem (1.9).

2.3 Przybliżone modele oddziaływań elektrostatycznych

Dla zapewnienia konsekwencji w hierarchii uproszczeń (1.18), w całej tej pracy przybliżony opis elektrostatyczny oparty na rozwinięciu CAMM lub ładunkach atomowych był obliczany w przybliżeniu metody SCF, w bazie 6-31G(d,p). Ponieważ jednak uwzględnienie korelacji elektronowej ma stosunkowo znaczący wpływ na molekularny rozkład ładunku, w rozdziale 4, poświęconym specyficznemu analizie jakości różnych przybliżeń elektrostatycznych, wykorzystano równolegle metodę funkcjonału gęstości B3LYP, dającą opis molekularnego rozkładu ładunku o jakości podobnej jak MP2 [139, 140].

2.3.1 Atomowe momenty multipolowe

Szczegółowa analiza jakości i przenośności opisu cząsteczkowego rozkładu ładunku opartego na atomowych elektrostatycznych momentach multipolowych wykonana została na przykładzie modelu CAMM [123]. Model ten, numerycznie równoważny innym definicjom atomowych momentów multipolowych [127], pozwala w systematyczny i komplementarny do wybranej definicji ładunku atomowego sposób uprościć informację o rozkładzie ładunku zawartą w macierzy gęstości elektronowej P (Równ. (2.9)):

$$m_a^{klm} = Z_a u_a^k v_a^l w_a^m - \sum_{r \in a} \sum_s P_{rs} \langle r | u^k v^l w^m | r \rangle - \underbrace{\sum_{k' > 0} \sum_{l' > 0} \sum_{m' > 0}}_{k'l'm' \neq klm} \binom{k}{k'} \binom{l}{l'} \binom{m}{m'} u_a^{k-k'} v_a^{l-l'} w_a^{m-m'} m_a^{k'l'm'} \quad (2.9)$$

m_a^{klm} jest momentem rzędu k , l i m -tego odpowiednio ze względu na współrzędne u , v , w atomu a . Pozostałe symbole oznaczają odpowiednio: Z_a ładunek jądra, P_{rs} elementy macierzy gęstości elektronowej, a $\langle r | u^k v^l w^m | r \rangle$ jest jednoelektronową całką multipolową. W przypadku metody Hartree-Focka, P jest identyczna z jednoelektronową macierzą gęstości; dla metod post-HF lub wielowyznacznikowych należy użyć uogólnionej macierzy gęstości [141].

Rozwinięcie (2.9) nie musi być ograniczone do centrów atomowych — uwzględnienie większej ilości punktów rozwinięcia prowadzi do bardziej precyzyjnego opisu rozkładu ładunku, choć większym kosztem obliczeniowym (model CMMM [128]). Ze względu jednak na konieczność transformacji konformacyjnej momentów położonych na centrach pozaatomowych, rozszerzenie to nie było przedmiotem przedstawionej tutaj analizy.

W niniejszej pracy, w większości przypadków momenty rzędu zerowego są równoznaczne z atomowymi ładunkami Mullikena [142] (o ile nie zaznaczono inaczej):

$$q_a \equiv m_a^{000} = Z_a - \sum_{r \in a} \sum_s \sum_t S_{rs}^v P_{ts} S_{tr}^{1-v} \quad (2.10)$$

gdzie S_{rs} oznaczają odpowiednie całki nakładania, a wykładnik v zależy od wyboru metody analizy populacyjnej (np. dla $v = 0$ lub 1 otrzymujemy definicję ładunków Mullikena, a dla $v = 0.5$ Löwdina). Ogólnie biorąc, v może przyjmować dowolne wartości, prowadząc do nieskończonej liczby możliwych analiz populacyjnych.

Wyższe momenty, które w notacji macierzowej można przedstawić jak w równaniach (2.11) (moment dipolowy), (2.12) (moment kwadrupolowy), etc. w systematyczny sposób

uzupełniają opis rozkładu ładunku, co wynika z rekurencyjnego charakteru definicji (2.9). Z tych względów, model CAMM może być użyty do uzupełnienia dowolnej definicji ładunku atomowego [124], jednocześnie zapewniając dobrze zdefiniowaną hierarchię przybliżeń.

$$\vec{\mu}_a \equiv (m_a^{100}, m_a^{010}, m_a^{001}) \quad (2.11)$$

$$\vec{\Theta}_a \equiv \begin{pmatrix} m_a^{200} & m_a^{110} & m_a^{101} \\ m_a^{110} & m_a^{020} & m_a^{011} \\ m_a^{101} & m_a^{011} & m_a^{002} \end{pmatrix} \quad (2.12)$$

Ponieważ momenty CAMM są zdefiniowane w lokalnych układach współrzędnych, tj. dla każdego atomu układ współrzędnych jest zlokalizowany na jądrze atomowym (Równ. (2.9)), opis CAMM molekularnego rozkładu ładunku można łatwo poddać translacji i rotacji do innych współrzędnych. Aby uprościć obliczenia energii oddziaływania, rotacja CAMM do nowych współrzędnych cząsteczkowych była dokonywana również tak, aby zapewniano jednakową orientację wszystkich lokalnych układów współrzędnych:

$$m_a'^{klm} = (\rho_a)^{k+l+m} \times m_a^{klm} \quad (2.13)$$

Indeksy a oznaczają transformację oddzielną dla każdego atomu. W rzeczywistości, macierz rotacji ρ_a była obliczana osobno dla każdego konformacyjnie sztywnego fragmentu cząsteczki.

Wyrażenie na (dwuciałową) energię oddziaływania między cząsteczkami A i B ma w tych warunkach postać (\vec{R}_{ab} oznacza wektor wodzący atomu a względem b , natomiast R_{ab} odległość):

$$\begin{aligned} E_{\text{CAMM}}^{(1)} = \sum_{a \in A} \sum_{b \in B} & \left[(q_a q_b R_{ab}^{-1} + q_b (\vec{\mu}_a \vec{R}_{ab}) R_{ab}^{-3} - q_a (\vec{\mu}_b \vec{R}_{ab}) R_{ab}^{-3} - 3(\vec{\mu}_a \vec{R}_{ab})(\vec{\mu}_b \vec{R}_{ab}) R_{ab}^{-5} \right. \\ & + q_b (\vec{R}_{ab} \vec{\Theta}_a \vec{R}_{ab}) R_{ab}^{-5} + q_a (\vec{R}_{ab} \vec{\Theta}_b \vec{R}_{ab}) R_{ab}^{-5} + 2(\vec{\mu}_b \vec{\Theta}_a \vec{R}_{ab}) R_{ab}^{-5} - 2(\vec{\mu}_a \vec{\Theta}_b \vec{R}_{ab}) R_{ab}^{-5} \\ & \left. - 5(\vec{\mu}_b \vec{R}_{ab})(\vec{R}_{ab} \vec{\Theta}_a \vec{R}_{ab}) R_{ab}^{-7} + 5(\vec{\mu}_a \vec{R}_{ab})(\vec{R}_{ab} \vec{\Theta}_b \vec{R}_{ab}) R_{ab}^{-7} + q_a \vec{R}_{ab} (\vec{R}_{ab} \vec{\Theta}_b \vec{R}_{ab}) R_{ab}^{-7} + \dots \right] \end{aligned} \quad (2.14)$$

Jest to szereg potęgowy, którego kolejne wyrazy znikają coraz szybciej z odległością. Prawidłowość tą wykorzystano do zdefiniowania hierarchii dokładności kolejnych przybliżeń

przez zakończenie rozwinięcia na wyrazach o tej samej zależności od odległości (ET). Alternatywny sposób polegający na uwzględnieniu wszystkich wyrazów zależnych od wybranego rzędu momentu multipolowego (ang. *moment-truncated*, MT) daje w niektórych przypadkach dokładniejsze wyniki, lecz stosunkowo większym kosztem obliczeniowym (uwzględnia więcej wyrazów).

Dla obliczeń potencjału elektrostatycznego generowanego przez rozwinięcie CAMM, wyrażenie (2.14) upraszcza się do:

$$V_{\text{CAMM}} = \sum_a \left[(q_a R_a^{-1} + (\vec{\mu}_a \vec{R}_a) R_a^{-3} + (\vec{R}_a \bar{\Theta}_a \vec{R}_a) R_a^{-5} + \vec{R}_a (\vec{R}_a \bar{\Omega}_a \vec{R}_a) R_a^{-7} + \dots \right] \quad (2.15)$$

Przez analogię do równań (2.14) i (2.15), w dalszej części tej pracy będzie używany symbol R^{-n} odnosząc się do wyrażenia na energię oddziaływania lub potencjał elektrostatyczny rozwiniętych do wyrazów zależnych od odległości jak R^{-n} włącznie.

2.3.2 Modele elektrostatyczne oparte na ładunkach punktowych

W wykorzystanej implementacji metody CAMM, momenty elektrostatyczne rzędu zerowego są obliczane metodą analizy populacyjnej Mullikena (Równ. (2.10)) [142]. Ponieważ jednak ładunki Mullikena niezbyt nadają się do opisu oddziaływań międzycząsteczkowych, przeprowadzono dla porównania równorzędną analizę jakości dla dwóch dostępnych implementacji definicji ładunków PDC [108–110]. Zarówno model Merz-Singh-Kollmana (MSK, [108, 110]) jak i RESP [109] dostarczają wartości ładunków atomowych mniej zależnych od wyboru punktów odniesienia dzięki zastosowaniu gęstej, kilkuwarstwowej siatki [109, 110]. Ponadto, aby zniwelować efekt statystycznej niedookreśloności atomów zagnieżdżonych, model RESP nakłada na wartości ładunków dodatkową hiperboliczną funkcję więzów, generując mniejsze wartości bezwzględne ładunków. Inne funkcje więzów można wykorzystać dla uśrednienia uzyskanego zestawu ładunków między różnymi konformacjami, a nawet między podobnymi atomami w różnych cząsteczkach. Szczegółowa dyskusja jakości modelu została opisana w pracy [143].

2.3.3 Porównanie jakości modeli przybliżonych

W części przypadków, analiza jakości różnych przybliżeń opiera się na porównaniach wartości potencjału elektrostatycznego w wybranych punktach lub, jak w przypadku przenośności konformacyjnej, odtwarzania kształtu krzywych opisujących energię oddziaływań w funkcji konformacji. Miara tego typu jest niepraktyczna lub trudna w interpretacji, jeśli chodzi o odtwarzanie molekularnego potencjału elektrostatycznego. W tym przypadku,

| Atom | Promień van der Waalsa | Promień kontaktowy |
|------|------------------------|--------------------|
| H | 1.2 Å | 2.6 Å |
| C | 1.7 Å | 3.1 Å |
| N | 1.5 Å | 2.9 Å |
| O | 1.4 Å | 2.8 Å |
| S | 1.85 Å | 3.25 Å |

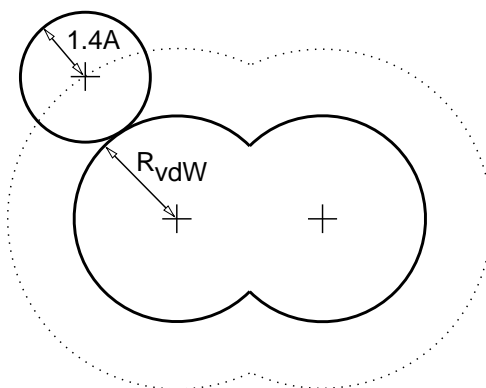
Tablica 2.1: Promienie atomowe definiujące powierzchnię kontaktową cząsteczki.

wykorzystano unormowane średnie odchylenie kwadratowe (ang. *relative root mean square*, RRMS) zaproponowane przez Kollmana [109]:

$$\text{RRMS}_V = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (V_i - V'_i)^2}{\sum_{i=1}^n V_i^2}} \quad (2.16)$$

gdzie V_i oznacza wartość spodziewaną potencjału elektrostatycznego (obliczoną metodą odniesienia, np. SCF), a V'_i potencjał przybliżony, w i -tym punkcie.

Sumowanie w równaniu (2.16) przebiega po punktach rozłożonych równomiernie po powierzchni cząsteczki. W naszym przypadku, siatka punktów generowana była wg algorytmu podanego przez Connolly-ego [144], jednak z użyciem promienia „sondy” równego 0, natomiast atomowe promienie van der Waalsa (wg Paulinga [145] i Bondiego [146]) zostały powiększone o promień cząsteczki wody 1.4 Å (Tabela 2.1). Tak określona powierzchnia nie jest zatem powierzchnią dostępną dla rozpuszczalnika, jak w pracy [144], lecz raczej powierzchnią kontaktową — w tym sensie, że odpowiada minimalnej odległości zbliżenia



Rysunek 2.4: Powierzchnia kontaktowa cząsteczki (zaznaczona linią kropkowaną).

jąder oddziałujących atomów (Rys. 2.4). Gęstość punktów wynosiła 10 punktów na \AA^2 .

2.4 Oprogramowanie

Obliczenia *ab initio* metodami orbitali molekularnych oraz DFT wykonano za pomocą programów Gaussian 94 [63] oraz GAMESS [62]. Rozkład energii oddziaływań na składowe przy użyciu metodologii Kitaury i Morokumy [36], Tomasiego [38] oraz Sokalskiego i Roszaka [7] wykonano wykorzystując zmodyfikowany pakiet GAMESS [147, 148]. Obliczenia rozwinięcia cząsteczkowego rozkładu ładunku w szereg multipolowy CAMM, przestrzennej transformacji CAMM, obliczenia energii oddziaływań $E_{\text{EL,MTP}}^{(1)}$ oraz molekularnego potencjału elektrostatycznego w przybliżeniu CAMM wykonano z pomocą własnego oprogramowania (FORTRAN, C). Ładunki atomowe Merz-Singh-Kollmana oraz RESP obliczono pakietem Gaussian 94 oraz ogólnodostępnym programem Resp [109].

Wykorzystano również oprogramowanie InsightII firmy Biosym (później Molecular Simulations, Inc.; obecnie Accelrys) [149], niezbędne dla przygotowania do obliczeń krystalograficznych struktur białek lub ich fragmentów oraz do nakładania przestrzennego enzymów pochodzących z różnych źródeł, wizualnej analizy i modyfikacji struktur. Ilustracje wykonano przy użyciu pakietu InsightII oraz ogólnodostępnych programów Molden [150], MolScript [151] i Molmol [152], natomiast wykresy za pomocą programu Gnuplot [153].

Seryjne obliczenia oraz analizy wyników wykonano oprogramowaniem własnym przy użyciu języków skryptowych (Unix shell, awk, python).

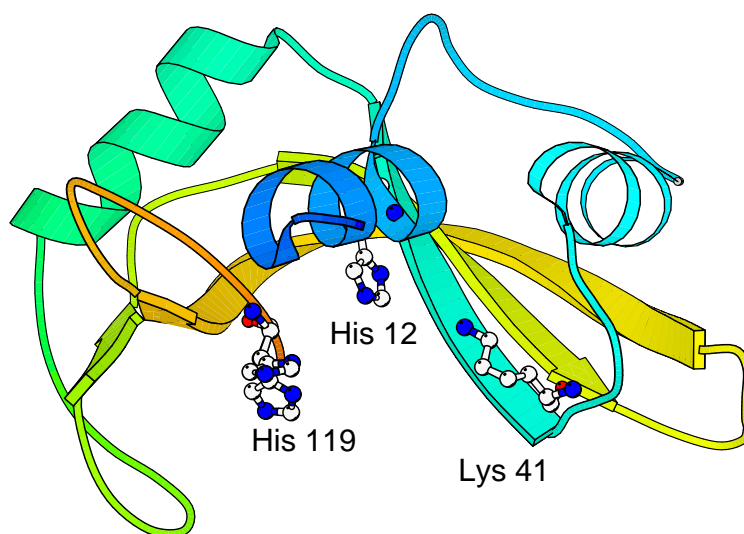
Rozdział 3

Analiza natury oddziaływań dla wybranych układów enzymatycznych

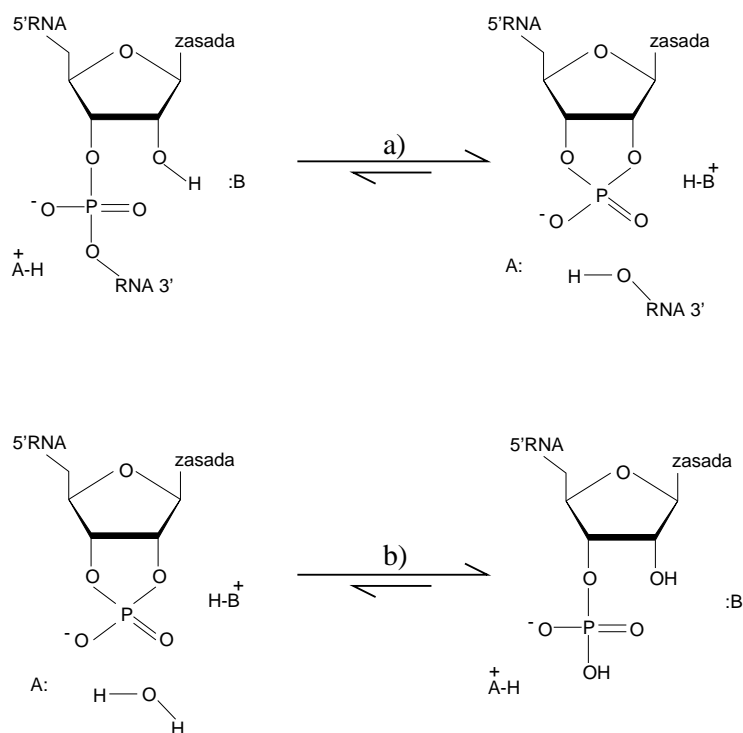
3.1 Efekty katalityczne w centrum aktywnym rybonukleazy A

Rybonukleaza A (Rys. 3.1) jest przedmiotem badań eksperymentalnych i teoretycznych od kilkudziesięciu lat [154], głównie ze względu na swoją prostą budowę, trwałość i wysoką aktywność katalityczną. Mimo to, szczegóły mechanizmu przeprowadzanej przez nią reakcji wciąż są nie do końca poznane. Wiadomo, że reakcja przebiega w dwóch etapach: w pierwszym następuje wewnątrzcząsteczkowa transestryfikacja powodująca powstanie cyklicznego 2', 3' fosforanu i odszczepienie połowy ciętego łańcucha RNA z wolną grupą 5'–OH; w drugim etapie, ten cykliczny produkt przejściowy jest hydrolizowany (Rys. 3.2). Wiadomo, że proces ten jest przykładem ogólnej katalizy kwasowo-zasadowej; przedmiotem kontrowersji jest natomiast wstępny stan protonacji reszt katalitycznych, a co za tym idzie, kwestia która reszta i kiedy działa jako kwas, a kiedy jako zasada, i jak wygląda rzeczywista ścieżka reakcji pierwszego etapu.

Jak dotychczas, najbardziej zaawansowane studia nad mechanizmem etapu transfosforylacji zostały opublikowane przez Władkowskiego, Kraussa i Stevensa [1, 155], rozważających ścieżkę z powstaniem monoanionowego produktu przejściowego. Nowsza praca Glennona i Warshela [156] stosuje bardziej kompletny model centrum aktywnego, uwzględniający efekty entropowe i wpływ rozpuszczalnika półempiryczną metodą wiązań walenicyjnych (ang. *empirical valence bond*, EVB [19]). Te ostatnie badania są próbą porównania wcześniejszych propozycji mechanizmu reakcji (m. in. przez mono- lub dianionowy produkt przejściowy [157, 158]) oraz ról katalitycznych poszczególnych reszt, ale nie prowadzą do roz-



Rysunek 3.1: Schemat struktury rybonukleazy A z trzustki wołu (kod PDB 3RN3). Pokazana jest konformacja trzech reszt centrum aktywnego uwzględnionych w modelu obliczeniowym.



Rysunek 3.2: Schemat reakcji hydrolizy kwasu rybonukleinowego przez rybonukleazę A. a) transfosforylacja; b) hydroliza cyklicznego produktu przejściowego.

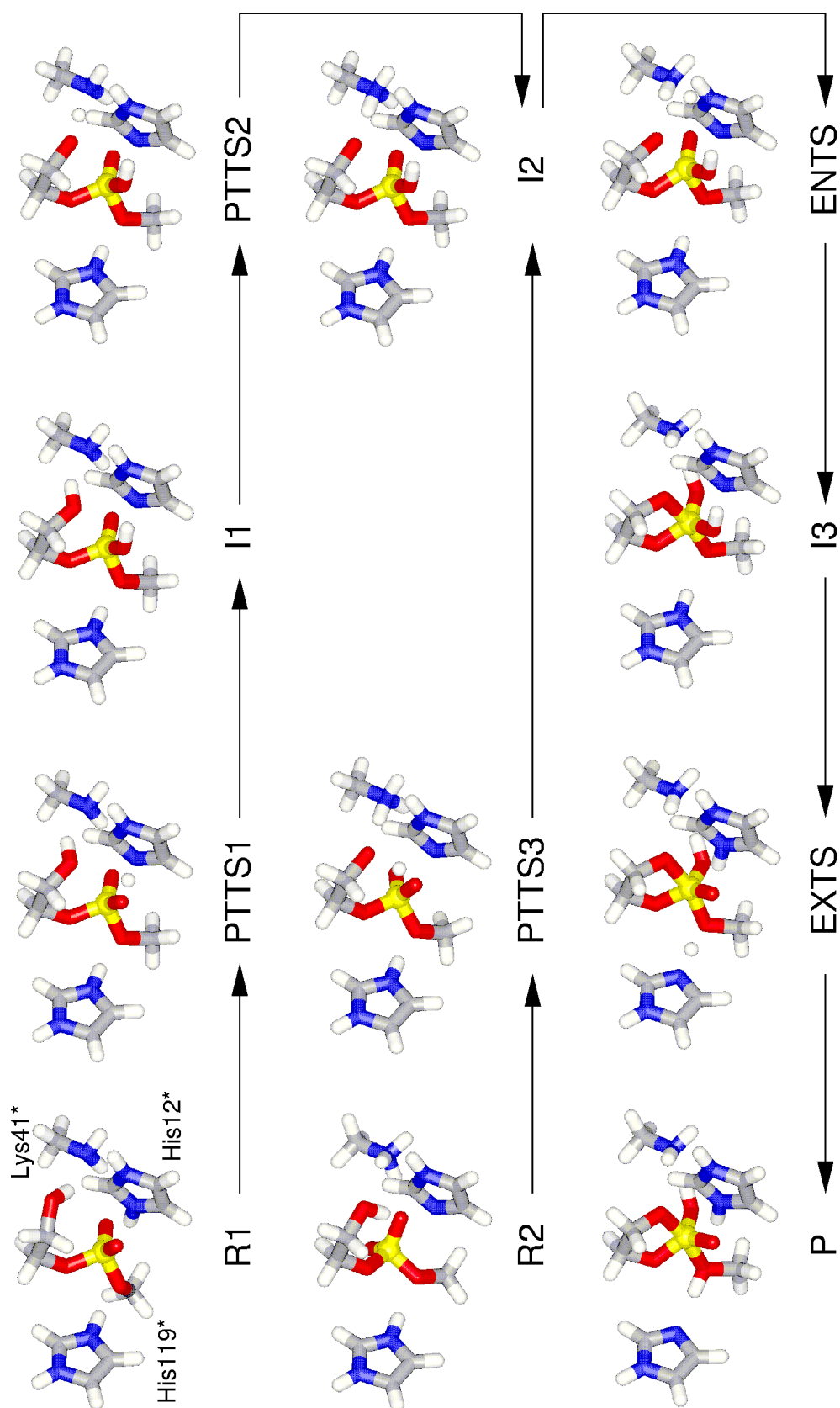
strzygających wniosków. W rzeczywistości, mimo że autorzy sugerują ścieżkę reakcji inną niż w pracy Władkowskiego i współpracowników, to mechanizm rozważany w pracy [155] okazuje się być korzystniejszy energetycznie. Mechanizm ten został wybrany do badań natury oddziaływań w centrum aktywnym [135].

3.1.1 Natura wpływu katalitycznego poszczególnych reszt

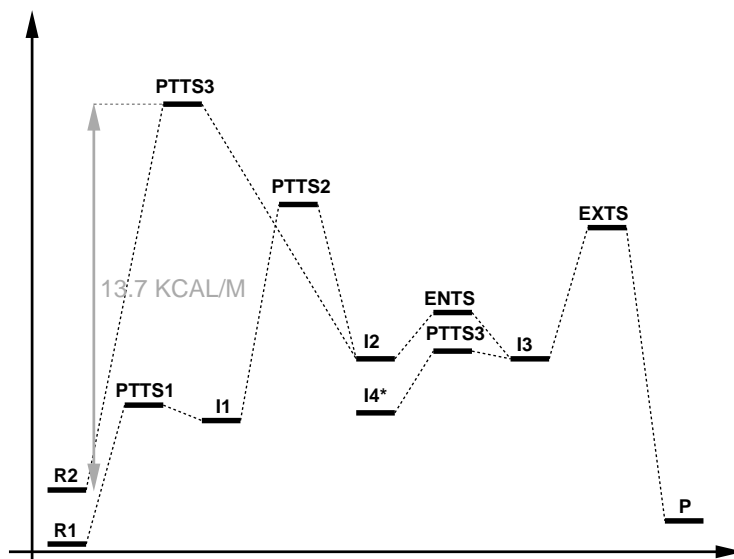
Ścieżkę reakcji zaproponowaną w pracy [1] prezentuje Rys. 3.3. Rozważone zostały dwa z wielu możliwych początkowych stanów protonacji układu, o różnych względnych barierach aktywacji (Rys. 3.4), ale ze względu na przybliżenia użytych metod obliczeniowych (RHF w bazie 3-21G(d), z funkcjami dyfuzyjnymi) nie było możliwe jednoznaczne określenie, która droga jest dominującą. Wiadomo, że uwzględnienie korelacji elektronowej oraz wpływu rozpuszczalnika prowadzi do zauważalnych zmian w energetyce reakcji [155].

Z punktu widzenia badań natury oddziaływań, największe możliwości analizy oferuje etap R2→PTTS3, ponieważ zachodzące tutaj przeniesienie protonu jest ograniczone do cząsteczki substratu (hydroksyetylo-metylofosforanu). Dzięki temu, można przeprowadzić analizę składowych energii oddziaływań tego substratu z każdą z uwzględnionych w modelu reszt katalitycznych. Na ścieżce startującej ze struktury R1, podobnie jak w dalszych, wspólnych etapach, mamy do czynienia z międzycząsteczkowym przeniesieniem protonu, co wyklucza analizę oddziaływań. Z tego względu, oprócz etapu R2→PTTS3 zbadano dla porównania tylko naturę wpływu katalitycznego (nie biorącej udziału w reakcji) histydyny 119 w etapach R1→...→PTTS2. Celem była odpowiedź na pytanie, czy efekty katalityczne są zdominowane przez oddziaływania określonej natury (prawdopodobnie elektrostatyczne), lub czy udział innych składowych oddziaływań, nawet jeśli nie jest zaniedbywalny, stanowi względnie stałą część całkowitych energii oddziaływań i stabilizacji. W obydwu przypadkach, możliwe byłoby wówczas co najmniej jakościowe prognozowanie wkładu katalitycznego poszczególnych reszt przy użyciu znacznie mniej kosztownych metod modelowania.

W pierwszym rzędzie, porównano jakość odtwarzania elektrostatycznej składowej energii oddziaływań przez powszechnie stosowane modele oparte na ładunkach punktowych. Zasadność takich badań wynika z kilku powodów: modele elektrostatyczne nie uwzględniają krótkozasięgowej składowej penetracyjnej, ponadto na małych odległościach mogą być rozbieżne. Problem ten został szerzej potraktowany w rozdziale 4. Analiza porównawcza dwóch modeli ładunków fitowanych do potencjału oraz dwóch wariantów rozwinięcia multipolowego CAMM dla tego konkretnego przypadku jest przedstawiona w Tabeli 3.1. Można zauważyć, że chociaż różnica między $E_{EL}^{(1)}$ a wartościami otrzymanymi metodami przybliżonymi jest rzędu kilku kcal/mol, to dla oddziaływań między naładowanymi czą-



Rysunek 3.3: Mechanizm reakcji transfosforylacji katalizowanej przez rybonukleazę A. Struktury i oznaczenia takie same jak w pracy [1].



Rysunek 3.4: Diagram przedstawiający względne wysokości barier aktywacji dla mechanizmu reakcji przedstawionego na rysunku 3.3 [1].

steczkami jest to względnie niewielkim błędem. Żeby jednak stwierdzić, że przybliżenie elektrostatyczne pozwala na wysuwanie prawidłowych wniosków co do roli katalitycznej lub wiążącej poszczególnych reszt, konieczna jest odpowiedź na pytanie, czy składowa elektrostatyczna $E_{EL}^{(1)}$ prawidłowo odtwarza całkowitą energię oddziaływań.

Dwuciałowe energie oddziaływań między odpowiednimi reagentami zostały obliczone metodą pola samouzgodnionego w bazie 6-31G(d,p) i poddane dekompozycji hybrydową metodą Sokalskiego i Roszaka [7] opisaną wcześniej. Wyniki, prezentowane w Tabeli 3.2, niestety nie potwierdzają oczekiwań. Można zauważyć, że chociaż w wielu przypadkach składowa elektrostatyczna jest bliska wartości całkowitej energii oddziaływania, to najczęściej powodem jest kasowanie się stosunkowo dużych wartości składowych wymiennej i delokalizacyjnej, mających przeciwne znaki. W ogólnym jednak przypadku, żaden z wkładów nie może być zaniedbany, ani nie stanowi stałej części energii oddziaływań. Przynajmniej, jeśli w grę wchodzi odległości tak małe, jak w badanym przypadku.

3.1.2 Wpływ stanu protonacji reszt na ich aktywność katalityczną

Analiza odtwarzania całkowitej nieempirycznej energii oddziaływań przez składową elektrostatyczną dla małych odległości prowadzi do niezbyt optymistycznego wniosku, że nie można na podstawie przybliżenia elektrostatycznego wnioskować o roli reszt centrum aktywnego w *wiązaniu* reagentów. Jednakże rola katalityczna jest uwarunkowana różnicą wiązania substratu i stanu przejściowego, co może sugerować, że niezaniechanie w ener-

| Para | $E_{q-q}^{(1)}(M)$ | $E_{q-q}^{(1)}(MSK)$ | $E_{CAMM}^{(1)}(R^{-3})$ | $E_{CAMM}^{(1)}(R^{-4})$ | $E_{EL}^{(1)}$ |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|
| R1 : His119 ⁺ | -34.01 | -29.75 | -32.91 | -32.76 | -36.35 |
| R1 : His119 δ | -10.03 | -11.66 | -14.08 | -13.72 | -18.67 |
| R1 : His119 ϵ | 11.46 | 9.26 | 10.84 | 11.21 | 8.32 |
| R2 : His119 ⁺ | -72.01 | -68.48 | -69.65 | -69.54 | -71.36 |
| R2 : His119 δ | -9.64 | -12.65 | -13.19 | -13.14 | -14.81 |
| R2 : His119 ϵ | 11.37 | 10.19 | 11.76 | 11.52 | 11.09 |
| R2 : His12 ⁺ | -68.89 | -66.43 | -67.14 | -67.09 | -69.97 |
| R2 : His12 δ | 3.12 | 4.11 | 3.51 | 3.83 | 1.97 |
| R2 : His12 ϵ | -7.54 | -9.40 | -9.74 | -9.42 | -11.72 |
| R2 : Lys41 ⁺ | -110.04 | -107.46 | -109.65 | -109.28 | -116.89 |
| R2 : Lys41 | -6.60 | -11.31 | -12.78 | -11.12 | -23.14 |
| I1 : His119 ⁺ | -25.33 | -22.29 | -25.57 | -25.04 | -28.10 |
| I1 : His119 δ | -8.02 | -9.38 | -12.03 | -11.74 | -16.13 |
| I1 : His119 ϵ | 10.47 | 8.32 | 10.00 | 10.08 | 7.23 |
| PTTS1 : His119 ⁺ | -29.45 | -26.37 | -29.79 | -29.18 | -32.67 |
| PTTS1 : His119 δ | -9.11 | -11.10 | -13.67 | -13.23 | -18.09 |
| PTTS1 : His119 ϵ | 11.63 | 9.38 | 11.21 | 11.33 | 8.46 |
| PTTS2 : His119 ⁺ | -29.36 | -26.52 | -29.38 | -28.89 | -31.74 |
| PTTS2 : His119 δ | -8.10 | -9.75 | -12.03 | -11.76 | -15.71 |
| PTTS2 : His119 ϵ | 10.52 | 8.61 | 10.15 | 10.30 | 7.85 |
| PTTS3 : His119 ⁺ | -76.00 | -71.35 | -73.85 | -73.44 | -76.24 |
| PTTS3 : His119 δ | -10.58 | -13.09 | -14.78 | -14.55 | -18.02 |
| PTTS3 : His119 ϵ | 12.19 | 10.68 | 12.28 | 12.45 | 10.50 |
| PTTS3 : His12 ⁺ | -81.53 | -79.64 | -80.24 | -79.46 | -85.32 |
| PTTS3 : His12 δ | 3.49 | 5.30 | 4.81 | 4.74 | 1.07 |
| PTTS3 : His12 ϵ | -10.36 | -13.17 | -13.82 | -12.59 | -17.39 |
| PTTS3 : Lys41 ⁺ | -110.77 | -109.90 | -113.93 | -111.33 | -117.72 |
| PTTS3 : Lys41 | -6.45 | -11.03 | -13.62 | -11.23 | -19.20 |

Tablica 3.1: Energie oddziaływania między resztami centrum aktywnego rybonukleazy A a ligandami ze struktur R1, PTTS1, I1, PTTS2, R2 i PTTS3 (rys. 3.3) obliczone w oparciu o dwa modele ładunków punktowych oraz model multipolowy CAMM (M – ładunki Mullikena, MSK – Merz-Singh-Kollmana [108, 110]). Wszystkie wartości w kcal/mol; symbole δ , ϵ określają sprotonowany atom azotu histydyny.

| Para | ΔE^{SCF} | $E_{\text{EL}}^{(1)}$ | $E_{\text{EX}}^{(1)}$ | $E_{\text{DEL}}^{(R)}$ | Odległość [\AA] |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|
| R1:His 119 δ | -7.32 | -18.67 | 18.25 | -6.90 | 1.76 |
| R1:His 119 $^+$ | -33.07 | -36.35 | 15.86 | -12.58 | 1.76 |
| PTTS1:His 119 δ | -6.03 | -18.09 | 19.06 | -7.01 | 1.74 |
| PTTS1:His 119 $^+$ | -28.89 | -32.67 | 16.51 | -12.73 | 1.74 |
| I1:His 119 δ | -4.49 | -16.13 | 17.74 | -6.10 | 1.76 |
| I1:His 119 $^+$ | -24.36 | -28.10 | 15.31 | -11.57 | 1.76 |
| PTTS2:His 119 δ | -5.80 | -15.71 | 15.50 | -5.59 | 1.81 |
| PTTS2:His 119 $^+$ | -29.36 | -31.74 | 13.37 | -10.99 | 1.81 |
| R2:His 119 δ | -13.51 | -14.81 | 4.92 | -3.62 | 2.29 |
| R2:His 119 $^+$ | -74.14 | -71.35 | 4.34 | -7.12 | 2.29 |
| R2:His 12 $^+$ | -70.91 | -69.97 | 4.17 | -5.11 | 2.36 |
| R2:His 12 δ | 3.73 | 1.97 | 4.04 | -2.28 | 2.36 |
| R2:His 12 ϵ | -9.43 | -11.72 | 4.84 | -2.56 | 2.36 |
| R2:Lys 41 | 1.82 | -23.14 | 34.78 | -9.83 | 1.70 |
| R2:Lys 41 $^+$ | -110.89 | -116.89 | 25.32 | -19.32 | 1.70 |
| PTTS3:His 119 δ | -11.09 | -18.02 | 12.94 | -6.01 | 1.87 |
| PTTS3:His 119 $^+$ | -75.71 | -76.24 | 11.27 | -10.75 | 1.87 |
| PTTS3:His 12 $^+$ | -84.73 | -85.32 | 9.97 | -9.37 | 1.82 |
| PTTS3:His 12 δ | 5.27 | 1.07 | 8.29 | -4.10 | 2.35 |
| PTTS3:His 12 ϵ | -11.98 | -17.39 | 10.60 | -5.20 | 1.82 |
| PTTS3:Lys 41 | -5.53 | -19.20 | 23.73 | -10.06 | 1.68 |
| PTTS3:Lys 41 $^+$ | -118.41 | -117.72 | 18.36 | -19.05 | 1.68 |

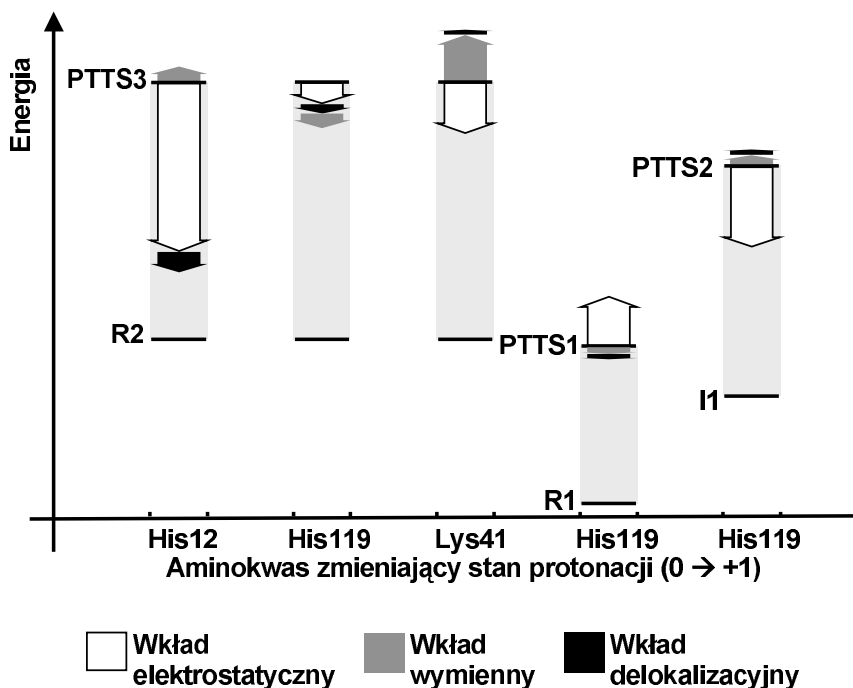
Tablica 3.2: Składowe energii oddziaływań reszt centrum aktywnego z odpowiednimi reagentami dla struktur R1, PTTS1, I1, PTTS2, R2 i PTTS3 z rysunku 3.3. Wszystkie wartości w kcal/mol; symbole δ , ϵ określają sprotonowany atom azotu histydyny.

giach oddziaływań składowe wymienna i delokalizacyjna ulegną skasowaniu w wartościach różnicowych energii stabilizacji. Przewidywania takie, ze względu na krótkozasięgowy charakter oddziaływań penetracyjnych i wymiennych, mogłyby być uzasadnione przynajmniej w przypadkach, w których odległość między oddziałującymi cząsteczkami jest taka sama w kompleksie substratów i w kompleksie aktywnym. Założenie to wydaje się być spełnione dla większości reszt w omawianym modelu, jako że różnice odpowiednich odległości nie przekraczają kilku setnych angstroma (por. Tabela 3.2).

| Bariera aktywacji | Reszta | Δ^{DTSS} | $\Delta E_{EL}^{(1)}$ | $\Delta E_{EX}^{(1)}$ | $\Delta E_{DEL}^{(R)}$ |
|----------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| R1→PTTS1 | His119 δ | 1.29 | 0.61 | 0.81 | -0.11 |
| | His119 $^+$ | 4.18 | 3.68 | 0.65 | -0.15 |
| | His 119 δ → His 119 $^+$ | 2.90 | 3.10 | -0.17 | -0.04 |
| I1→PTTS1 | His119 δ | -1.54 | -1.96 | 1.32 | -0.91 |
| | His119 $^+$ | -4.53 | -4.57 | 1.20 | -1.16 |
| | His 119 δ → His 119 $^+$ | -2.98 | -2.61 | -0.12 | -0.24 |
| I1→PTTS2 | His119 δ | -1.31 | 0.42 | -2.24 | 0.51 |
| | His119 $^+$ | -5.00 | -3.64 | -1.94 | 0.58 |
| | His 119 δ → His 119 $^+$ | -3.69 | -4.06 | 0.30 | 0.08 |
| R2→PTTS3 | His12 δ | 1.53 | -0.90 | 4.25 | -1.81 |
| | His12 $^+$ | -13.81 | -15.35 | 5.80 | -4.27 |
| | His119 δ | 2.42 | -3.20 | 8.02 | -2.40 |
| | His119 $^+$ | -1.57 | -4.88 | 6.93 | -3.62 |
| | Lys41 0 | -7.34 | 3.93 | -11.05 | -0.23 |
| | Lys41 $^+$ | -7.52 | -0.83 | -6.95 | 0.25 |
| | His12 δ → His12 $^+$ | -15.35 | -14.45 | 1.55 | -2.45 |
| | His119 ϵ → His119 $^+$ | -3.65 | -4.28 | 3.69 | -3.06 |
| Lys 41 → Lys 41 $^+$ | -0.17 | -4.77 | 4.10 | 0.50 | |

Tablica 3.3: Składowe różnicowych energii stabilizacji wybranych stanów przejściowych oraz różnicowy wpływ protonacji reszt katalitycznych rybonukleazy A na energie stabilizacji.

Tabela 3.3 prezentuje analizę składowych energii stabilizacji; ponadto, obliczono różnicowy wpływ protonacji reszt na ich efekt katalityczny. Te ostatnie wyniki, w porównaniu z odpowiednimi energiami aktywacji, są również prezentowane w formie wizualnej na Rys. 3.5. Niestety, i tym razem okazuje się, że nie można zaniedbać żadnej ze składowych. Co gorsza, przewidywania roli katalitycznej reszt oparte na przybliżeniu elektrostatycznym dla odległości kontaktowych mogą być nie tylko niedokładne, ale wręcz jakościowo błędne — w jednej trzeciej przypadków prezentowanych w Tabeli 3.3 całkowita energia różnicowej stabilizacji Δ^{DTSS} (na poziomie metody SCF) i jej składowa elektrostatyczna $\Delta E_{EL}^{(1)}$ mają różne znaki. Oczywiście, nie bez znaczenia jest fakt, że wartości względnej energii stabilizacji są tutaj niemal o rząd mniejsze niż energii oddziaływań; niemniej jednak, wyniki te dowodzą, że nie można *a priori* zakładać stosowności przybliżenia elektrostatycznego dla tak bliskich kontaktów molekularnych.



Rysunek 3.5: Diagram przedstawiający względne wkłady różnych składowych różnicowych energii stabilizacji do obniżenia barier aktywacji przy zmianie stanu protonacji niektórych reszt katalitycznych.

3.1.3 Natura oddziaływań katalitycznych w funkcji odległości

Badania natury oddziaływań takie, jak przedstawione powyżej, można przeprowadzić dopiero dysponując strukturami substratów i kompleksu aktywnego, co uniemożliwia wstępną weryfikację założeń i hipotez dotyczących mechanizmu reakcji. Interesująca jest zatem odpowiedź na pytanie, w jakich granicach można stosować do tego celu metody przybliżone. Stan sprotonowania interesujących reszt nie daje podstaw uzasadniających taki wybór: przykładowo, stabilizacja PTTS3 wobec R2 przez lizynę 41 jest zdominowana przez składową wymienną, niezależnie od stanu protonacji reszty.

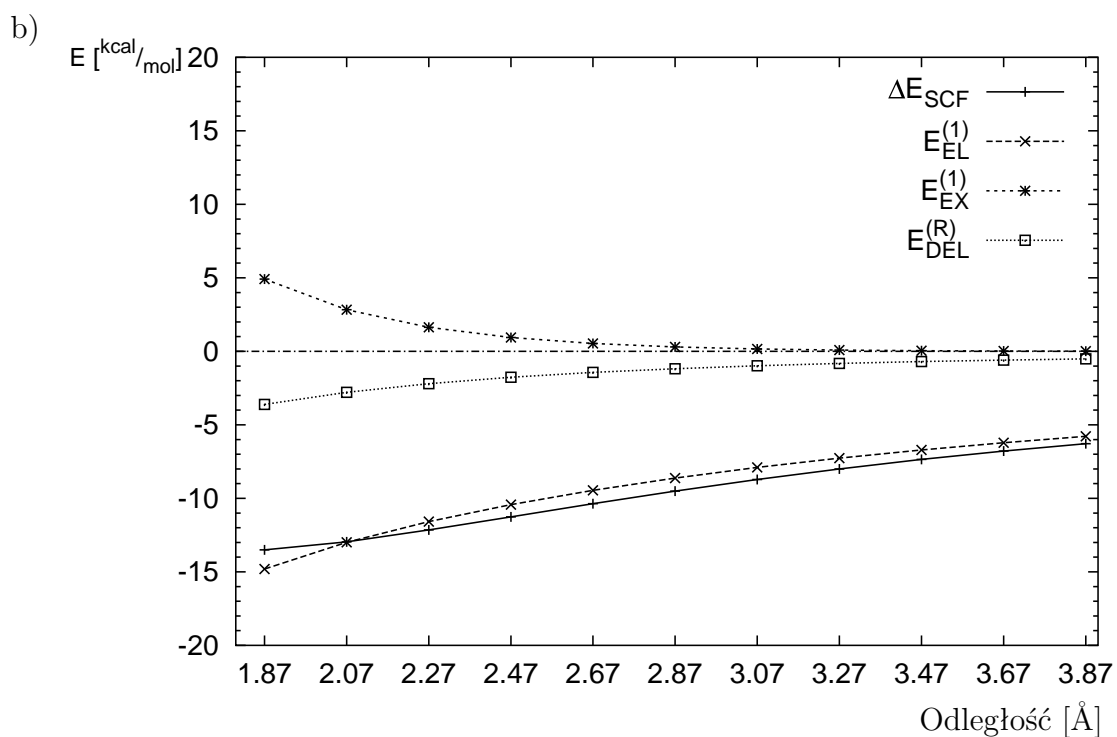
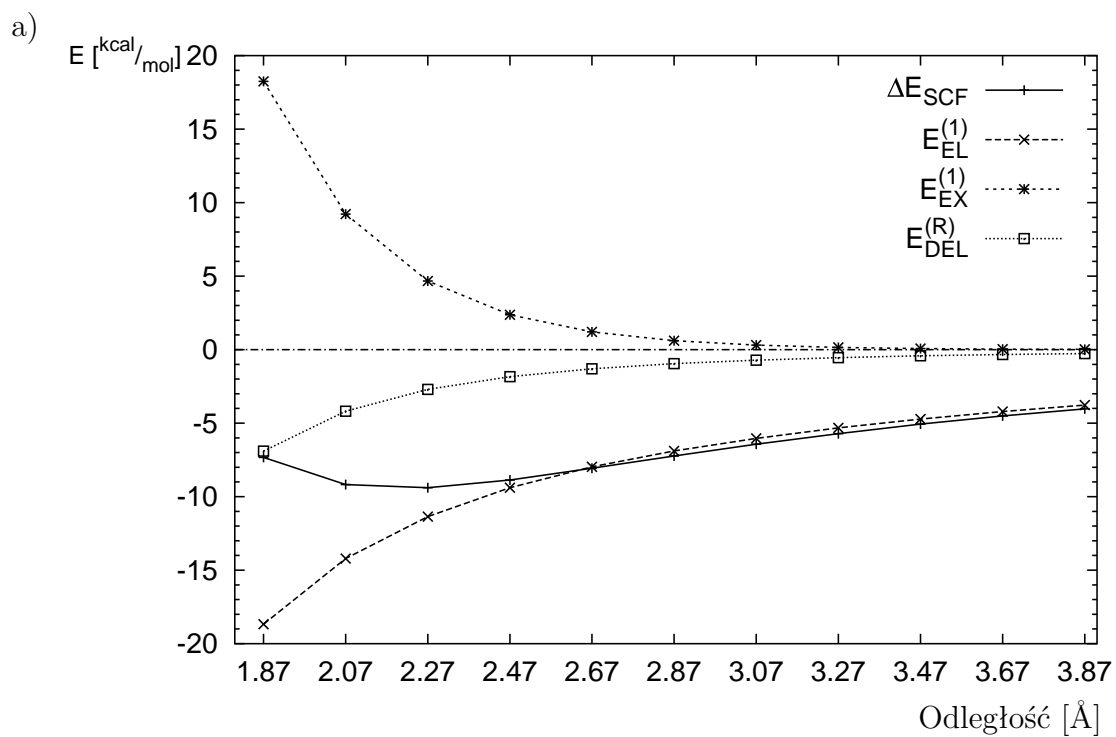
Ze względu na krótkozasięgowy charakter zarówno oddziaływań wymiennych, jak efektów składających się na $E_{\text{DEL}}^{(R)}$, można przewidzieć dominującą rolę elektrostatyki na większych odległościach. Jest to przyjmowane jako truizm w literaturze przedmiotu. Warto natomiast precyzyjniej określić zakres stosowalności przybliżenia elektrostatycznego oraz sprawdzić, czy wyniki modelowania ról potencjalnie katalitycznych reszt metodami przybliżonymi w zakresie ich stosowalności można ekstrapolować do odległości kontaktowych.

Odpowiedzi na obydwa te pytania dostarcza analiza składowych energii oddziaływań (Rys. 3.6) oraz składowych różnicowych energii stabilizacji (Rys. 3.7) w funkcji odległości. Rysunek 3.3 prezentuje wyniki takiej analizy dla histydyny 119, które mogą być porównane

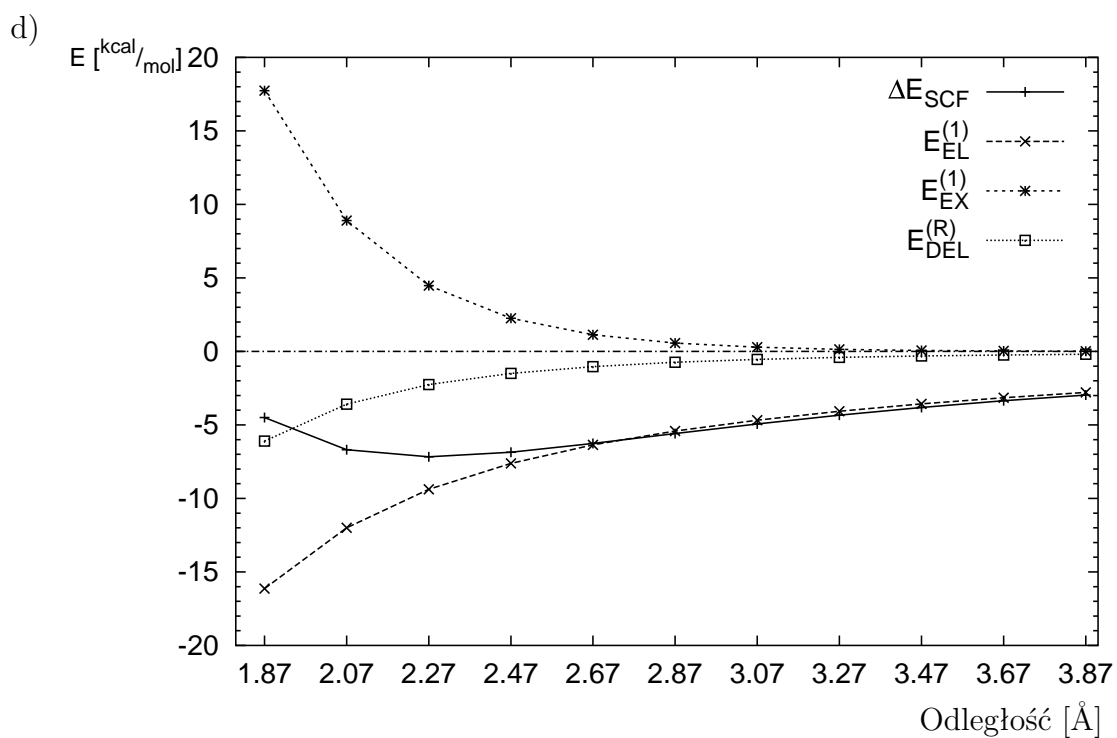
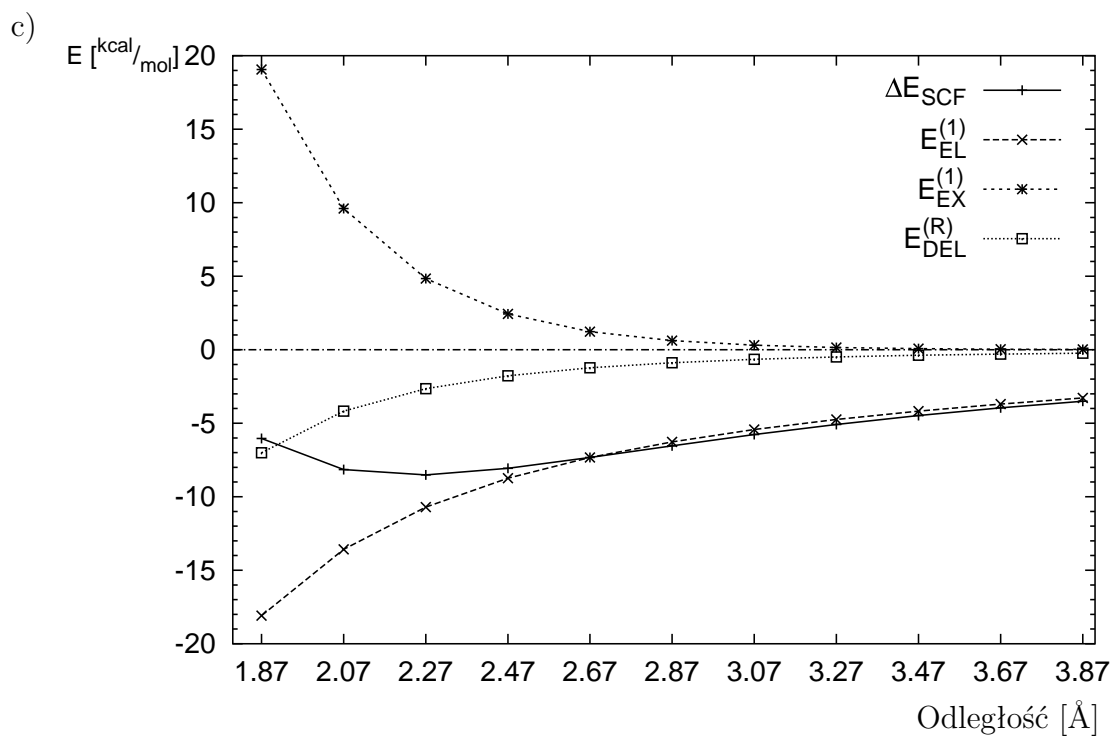
dla kilku etapów, oraz między alternatywnymi ścieżkami reakcji.

Wykresy składowych energii oddziaływań (Rys. 3.6) pokazują, że mimo znacznych rozbieżności całkowitej energii oddziaływań i jej składowej elektrostatycznej na małych odległościach, to nadal przybliżenie elektrostatyczne jest wystarczające do formułowania wniosków jakościowych (dotyczących wkładu reszty w wiązanie ligandu), tj. znak składowej $E_{\text{EL}}^{(1)}$ jest zgodny ze znakiem ΔE^{SCF} . Oczywiście, nie będzie to zawsze słuszne, jako że ΔE^{SCF} wykazuje minimum, natomiast wszystkie składowe są monotoniczne. Dla niewielkich energii wiązania, lub dla bardzo małych odległości, można się wobec tego spodziewać wystąpienia różnic jakościowych. Zbadane przypadki sugerują jednak, że jest to stosunkowo mało prawdopodobne. Różnica między ΔE^{SCF} a $E_{\text{EL}}^{(1)}$ szybko jednak zanika z odległością, i przy ok. 2.7 Å staje się praktycznie zaniedbywalna. Wniosek ten potwierdzają także wyniki analizy różnicowych energii stabilizacji (Rys. 3.7), dla których niewystarczająca dokładność przybliżenia elektrostatycznego jest bardziej oczywista. Także w tym przypadku, rozsuniecie oddziałujących podukładów na odległość ok. 2.7 Å prowadzi do zadowalającej zbieżności składowej elektrostatycznej z całkowitą energią stabilizacji. Oczywiście, trudno przyjąć tę liczbę jako granicę stosowalności przybliżenia elektrostatycznego na podstawie analizy dokonanej dla jednego tylko enzymu. W związku z tym, podobne testy wykonano także dla mutazy choryzmianowej (rozdział 3.2). Wydaje się jednak, że zgodność tego wyniku między różnymi parami oddziałujących podukładów może sugerować, że w ogólnym przypadku uzasadnione jest założenie — z pewnym marginesem — wartości ok. 3 Å jako minimalnej odległości, dla której przybliżenie elektrostatyczne względnie dokładnie odtwarza całkowitą wartość energii oddziaływań (lub różnicowej energii stabilizacji).

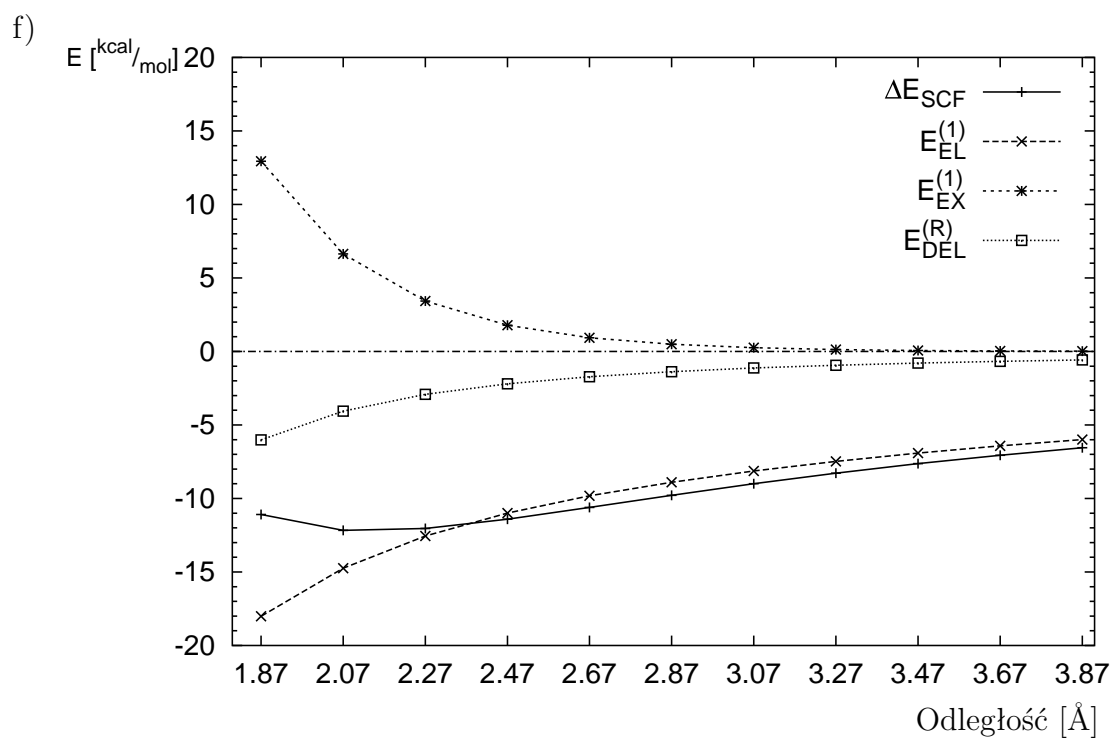
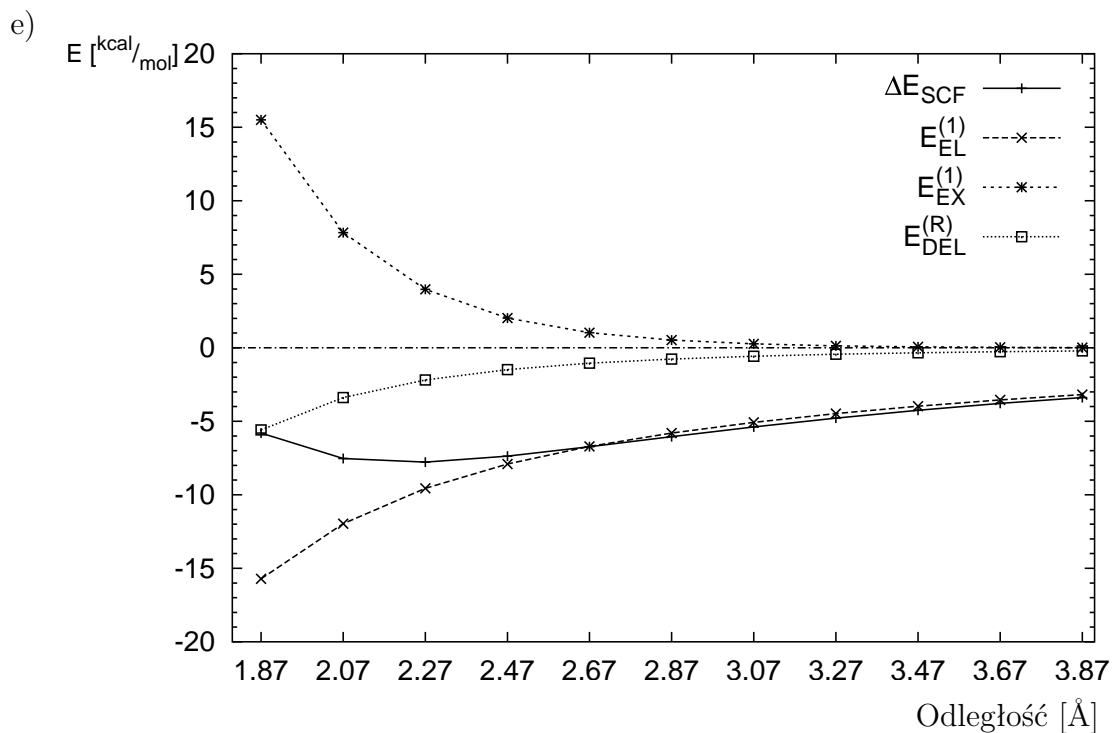
Niestety, składowa $\Delta E_{\text{EL}}^{(1)}$ różnicowych energii stabilizacji dla małych odległości może nie zachowywać nawet znaku Δ^{DTSS} (wykresy c, d na Rys. 3.7). Oznacza to, że nie można wyciągać wniosków co do rzeczywistego efektu katalitycznego danej reszty na podstawie wyników dla większych odległości — w zakresie zbieżności użytego modelu. W rzeczywistości, efekt katalityczny reszty może być jakościowo inny przy zmianie odległości o 1 Å, co nie zawsze jest odtwarzane przez składową elektrostatyczną (Rys. 3.7).



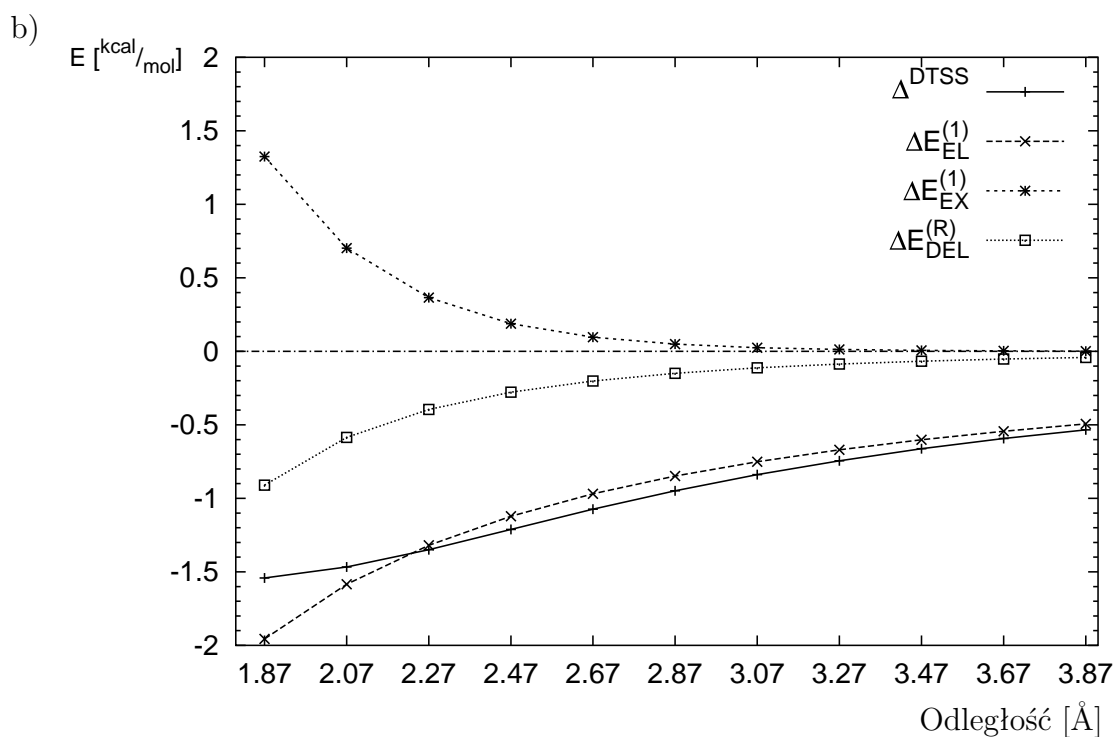
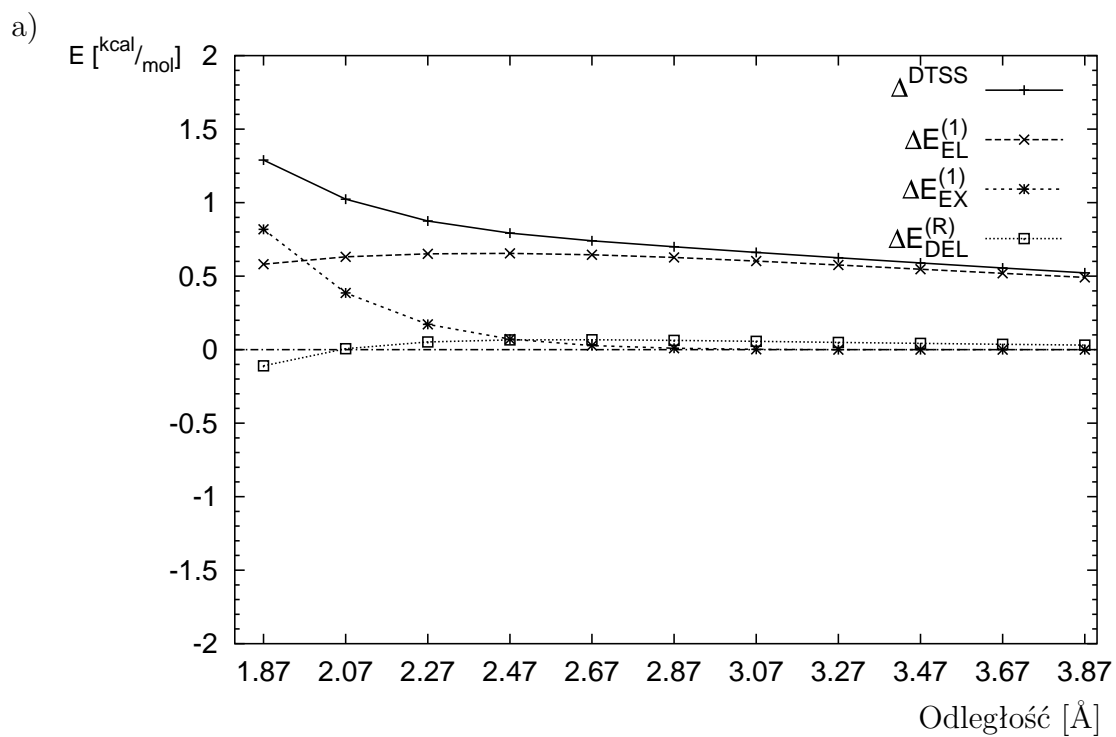
Rysunek 3.6: Wykresy zależności od odległości składowych energii oddziaływań histydyny 119 (w formie δ) z różnymi reagentami: a) z substratem R1, b) z substratem R2,



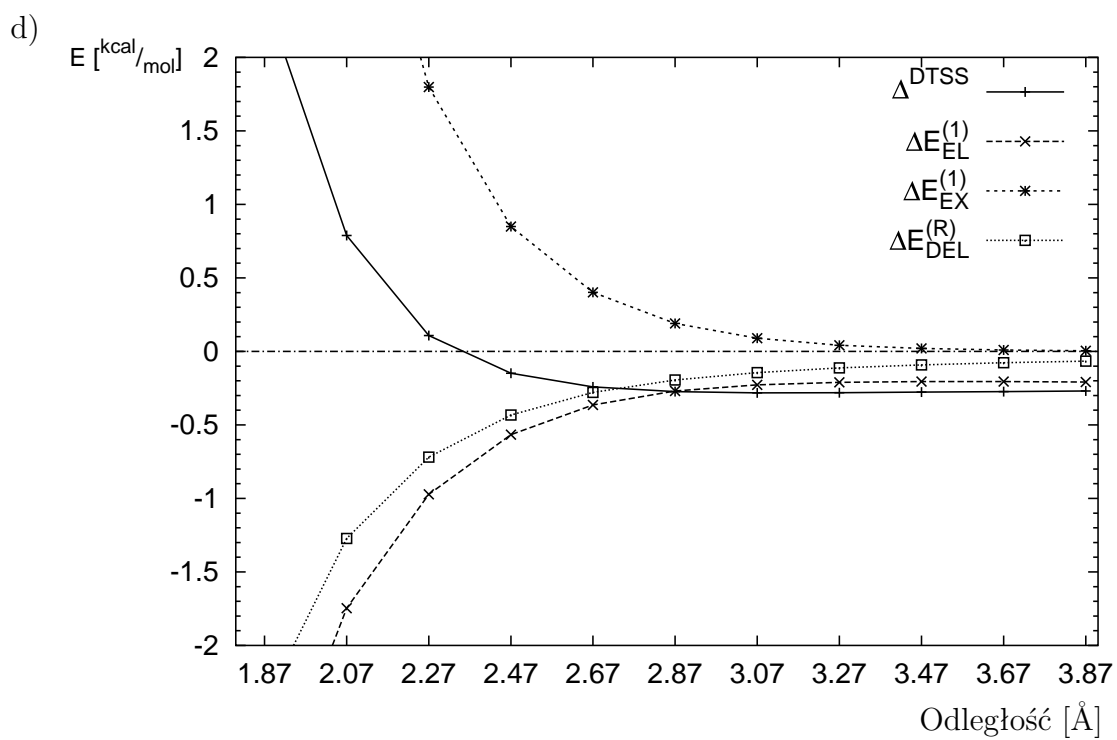
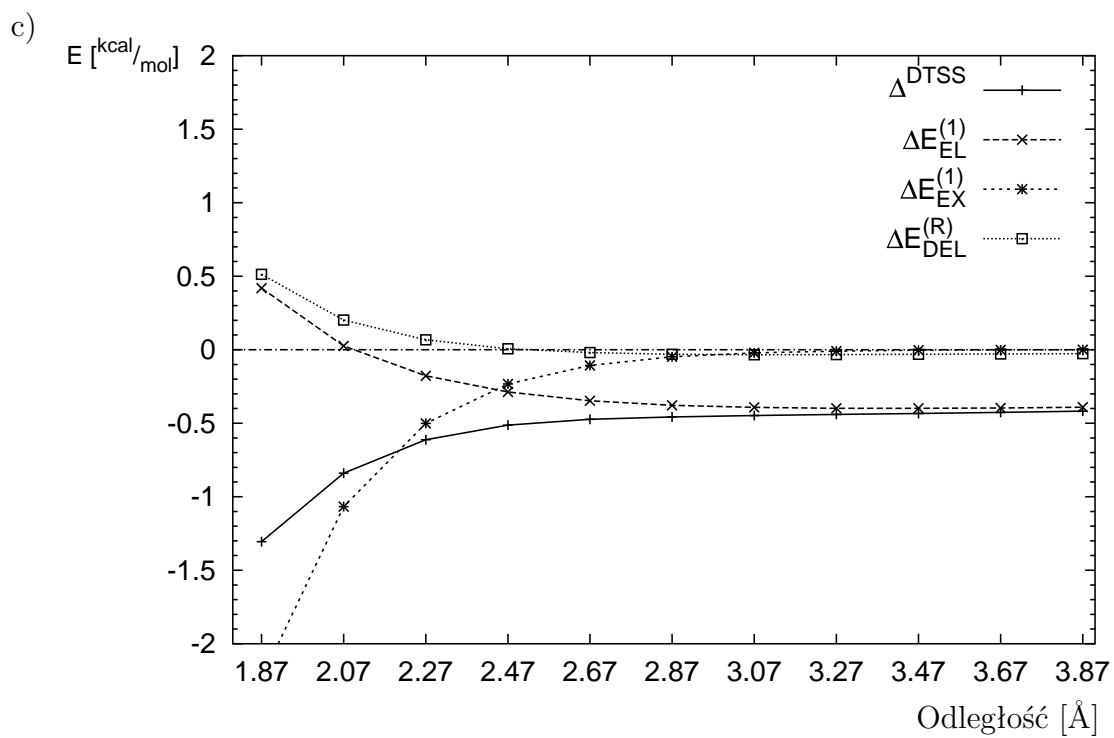
Rysunek 3.6: (kontynuacja) c) oddziaływanie His 119 δ z PTTS1,
d) z produktem przejściowym II,



Rysunek 3.6: (kontynuacja) e) oddziaływanie His 119 δ z PTTS2, f) z PTTS3.

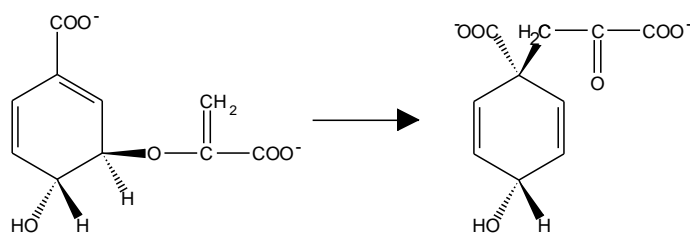


Rysunek 3.7: Analiza zależności od odległości składowych różnicowych energii stabilizacji stanów przejściowych wobec odpowiednich substratów przez histydynę 119 w formie δ : a) stabilizacja PTTS1 wobec R1, b) stabilizacja PTTS1 wobec I1,



Rysunek 3.7: (kontynuacja) c) stabilizacja PTTS2 wobec I1,
d) stabilizacja PTTS3 wobec R2.

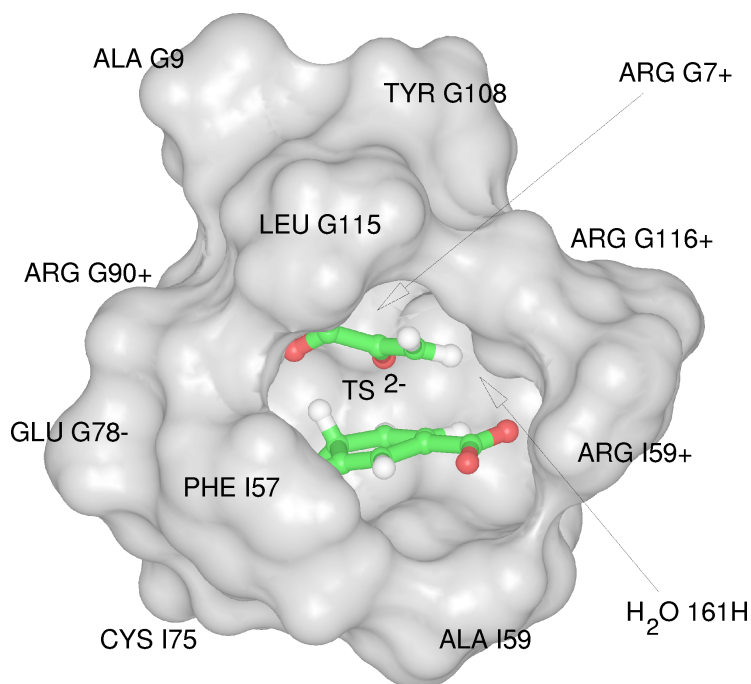
3.2 Analiza natury oddziaływań w centrum aktywnym mutazy choryzmianowej



Rysunek 3.8: Przegrupowanie Claisena katalizowane przez mutazę choryzmianową.

Mutaza choryzmianowa jest ważnym enzymem ścieżki biosyntezy aminokwasów aromatycznych organizmów prokariotycznych, grzybów i roślin [138]. Przyspiesza ona ok. 10^6 razy transformację choryzmicanu do prenylanu (Rys. 3.8), będącą przykładem przegrupowania Claisena. Enzym ten z wielu powodów stanowi ciekawy przedmiot badań [81, 159, 160]. Reakcja przeprowadzana przez mutazę zachodzi również samorzutnie w roztworze, co stwarza możliwość badań porównawczych. Znana jest struktura przestrzenna białka z zadokowanym produktem oraz analogiem stanu przejściowego [161], a centrum reakcji jest względnie niewielkie, dlatego liczba studiów teoretycznych studiów nad mechanizmem reakcji jest znacząca [81] i stale rośnie [162–166]. Dla celów tej pracy, jego wybór uzasadniony jest z dwóch powodów. Mutaza choryzmianowa nie reaguje ze swoim substratem, dzięki czemu możliwe jest obliczenie energii oddziaływań i stabilizacji reagentów przez każdą resztę centrum aktywnego. Ponadto, kieszeń katalityczna zbudowana jest z wielu zjonizowanych reszt (Rys. 3.9), komplementarnych względem ujemnie naładowanych reagentów.

Mimo licznych studiów nad mechanizmem reakcji przeprowadzanej przez mutazę choryzmianową, nie tylko szczegóły mechanizmu, ale nawet natura podstawowych czynników odpowiedzialnych za efekt katalityczny jest ciągle przedmiotem dyskusji. Z jednej strony, eksperymentalne oraz teoretyczne badania efektów izotopowych [167, 168] i efektów mutacji [169] oraz teoretyczne modele reakcji [170] sugerują dominującą rolę elektrostatycznej stabilizacji stanu przejściowego. Alternatywna teza, o przeważającym znaczeniu entropii aktywacji, mianowicie przez preferencyjne wiązanie energetycznie niekorzystnego lecz reaktywnego konformeru, znalazła eksperymentalne uzasadnienie dla enzymów pochodzących z *Klebsiella pneumoniae* i *Streptomyces aureofaciens* [89] oraz dla przeciwciał katalitycznych [171]. W tej pracy, badania przeprowadzono dla enzymu pochodzącego z *Bacillus subtilis*, dla którego entropia aktywacji jest niewielka [89]. Najnowsze prace [81, 162] (również dotyczące enzymu z *B. subtilis*) argumentują, że znaczący efekt katalityczny osiągany



Rysunek 3.9: Centrum aktywne mutazy choryzmianowej z bakterii *Bacillus subtilis*, na podstawie struktury 1CHT z Protein Data Bank [161].

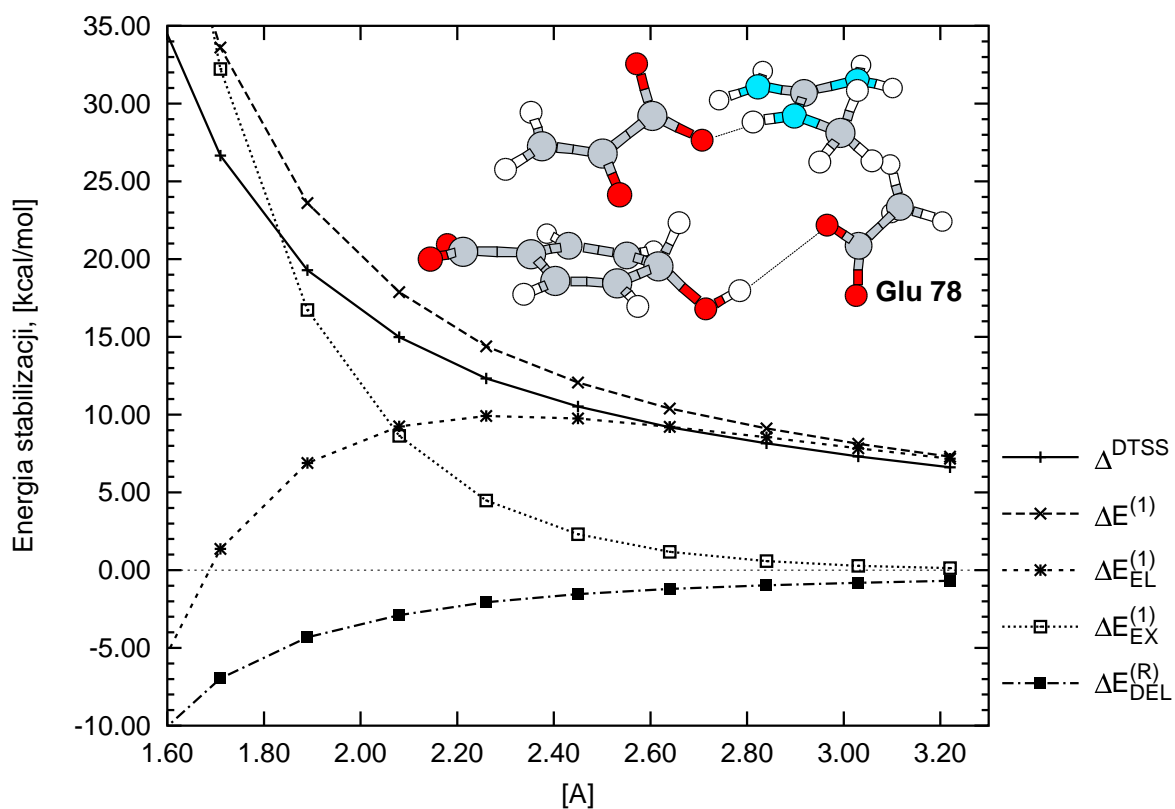
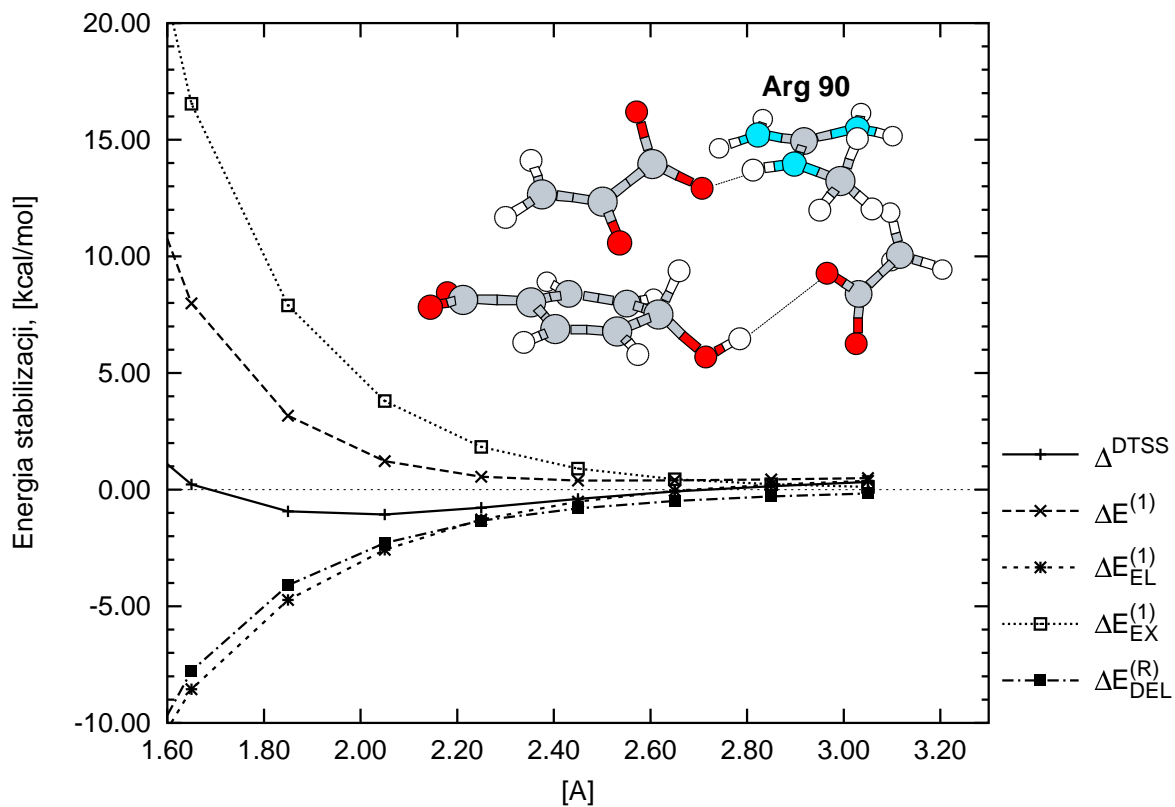
jest przez mechaniczną kompresję reagentów w aktywnej konformacji.

Wyniki te są tylko pozornie sprzeczne — raczej należy je rozumieć w ten sposób, że różne efekty katalityczne są tutaj dobrze zrównoważone, a przewaga tego lub innego może zależeć głównie od metody badań lub warunków eksperymentalnych. Na przykład, teoretyczne obliczenia barier aktywacji sugerują większą niż obserwowana wydajność katalityczną [81]. Mierzona eksperymentalnie szybkość reakcji może być zatem ograniczana innymi efektami. W tak złożonych układach, jak enzymy, zarówno najistotniejsze składniki energii aktywacji jak i czynniki ograniczające wydajność katalityczną zależą m.in. od budowy (pochodzenia) enzymu i warunków reakcji, na przykład stężeń reagentów oraz regulatorów allosterycznych.

Dla celów weryfikacji stosowalności przybliżenia elektrostatycznego, wielkość nieelektronowych składowych entalpii swobodnej aktywacji nie jest istotna. Z drugiej strony, obecny pogląd na dominującą rolę mechanicznej deformacji aktywnego konformeru [162] wymaga uwzględnienia w badaniach teoretycznych stosunkowo dużego modelu centrum aktywnego, np. metodami QM/MM, z jednoczesnym możliwie dokładnym opisem oddziaływań. Ponadto, ponieważ zarówno centrum aktywne, jak i stan przejściowy są silnie polarne [161, 167–169] (patrz także Rys. 3.9) zachowanie się różnych składowych energii oddziaływań i względnej stabilizacji powinno być miarodajną informacją, przydatną do budowy modeli teoretycznych dla tego lub innych, silnie polarnych katalizatorów.

Analiza składowych energii oddziaływań oraz różnicowych energii stabilizacji stanu przejściowego w funkcji odległości została wykonana dla większości reszt centrum aktywnego mutazy choryzmianowej (Rys 3.9). Do obliczeń wykorzystano struktury substratu oraz stanu przejściowego opublikowane przez Mengera i współpracowników [81] z tym, że konformacja substratu została dopasowana do centrum aktywnego enzymu przez obrót wokół wiązania eterowego tak, aby zminimalizować konflikty steryczne z resztami białka. Struktury do obliczeń przygotowano przy użyciu pakietu InsightII [149].

Przeciętne wartości zarówno energii oddziaływań, jak i różnicowych energii stabilizacji były znacznie większe niż dla oddziaływań w centrum aktywnym rybonukleazy A, opisanych w rozdziale 3.1, co pozwala rozszerzyć zakres stosowalności wniosków płynących z niniejszej analizy. Można zaobserwować, że w tym przypadku jakościowa zgodność (znaku) składowej elektrostatycznej $E_{\text{EL}}^{(1)}$ z energią oddziaływań ΔE^{SCF} jest zachowana praktycznie w całym zakresie odległości mimo, że rozbieżność ilościowa zaczyna pojawiać się także w okolicy 2.6–2.7 Å. Podobnie zachowują się różnicowe energie stabilizacji. Odpowiednie wykresy pominięto dla oszczędności miejsca; godna uwagi natomiast jest obserwowana natura różnicowej stabilizacji stanu przejściowego przez dwie reszty centrum aktywnego, mianowicie argininę 90 i glutaminian 78 (Rys. 3.10). Zakres zbieżności oraz zgodność znaku Δ^{DTSS} i $\Delta E_{\text{EL}}^{(1)}$ są tutaj reprezentatywne dla wszystkich badanych dla tego enzymu oddziaływań; o ile jednak w pozostałych przypadkach obie krzywe mają charakter monotoniczny, tutaj obserwujemy nieodtwarzane przez składową elektrostatyczną minimum na krzywej Δ^{DTSS} (Arg 90), lub „fałszywe” maksimum $\Delta E_{\text{EL}}^{(1)}$ dla oddziaływań z Glu 78. Co ciekawe, obie te reszty są uznawane za krytyczne dla katalizy [166, 169, 170]. Niezdolność do prawidłowego odtwarzania tego typu efektów przez przybliżenie elektrostatyczne, lub raczej jego ekstrapolację do tak niewielkich odległości międzyatomowych, nie powinna być znacząca w większości przypadków. Istnieją jednak doniesienia, że obecność i położenie ekstremum potencjału elektrostatycznego wewnątrz powierzchni van der Waalsa cząsteczki jest istotna dla oddziaływań międzycząsteczkowych [172–174].



Rysunek 3.10: Analiza składowych energii stabilizacji stanu przejściowego dla wybranych reszt centrum aktywnego mutazy choryzmianowej.

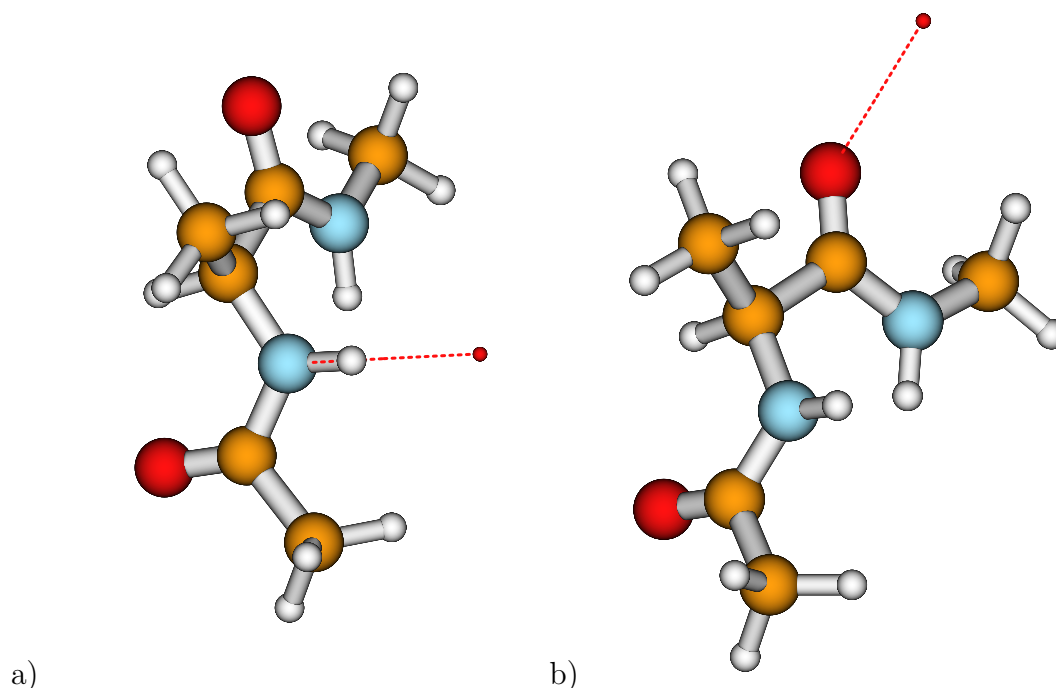
Rozdział 4

Analiza jakości i przenośności anizotropowych modeli rozkładu ładunku

4.1 Odtwarzanie MEP oraz energii oddziaływań

4.1.1 Biblioteka nieskorelowanych i skorelowanych multipoli atomowych CAMM dla aminokwasów

Do celów analizy dokładności oraz przenośności modelu rozkładu ładunku CAMM między różnymi konformacjami i otoczeniami molekularnymi, jak również z myślą o zastosowaniach do modelowania białek, stworzona została kompletna biblioteka CAMM dla naturalnych α -L-aminokwasów z uwzględnieniem wszystkich form protonacji w łańcuchach bocznych. Ze względu na konieczność prawidłowego odtworzenia rozkładu ładunku na atomach wiązania peptydowego, obliczenia wykonano dla cząsteczek podstawionych grupą acetylową przy grupie α -aminowej oraz N-metyloaminą przy α -karbonylu. Geometria wszystkich struktur została zoptymalizowana na poziomie metody SCF w bazie 6-31G(d,p) przy użyciu pakietu Gaussian 94 [63]. Obliczeń funkcji falowych dokonano w tej samej bazie metodą pola samouzgodnionego SCF oraz hybrydową metodą funkcjonału gęstości Lee-Yang-Parr z korektą wymiany wg. Becke (B3LYP, [42]). CAMM do momentów oktupolowych włącznie policzono przy użyciu własnego oprogramowania, korzystając z macierzy gęstości elektronowej dla zoptymalizowanych struktur, uzyskanych za pośrednictwem pakietu Gaussian 94.



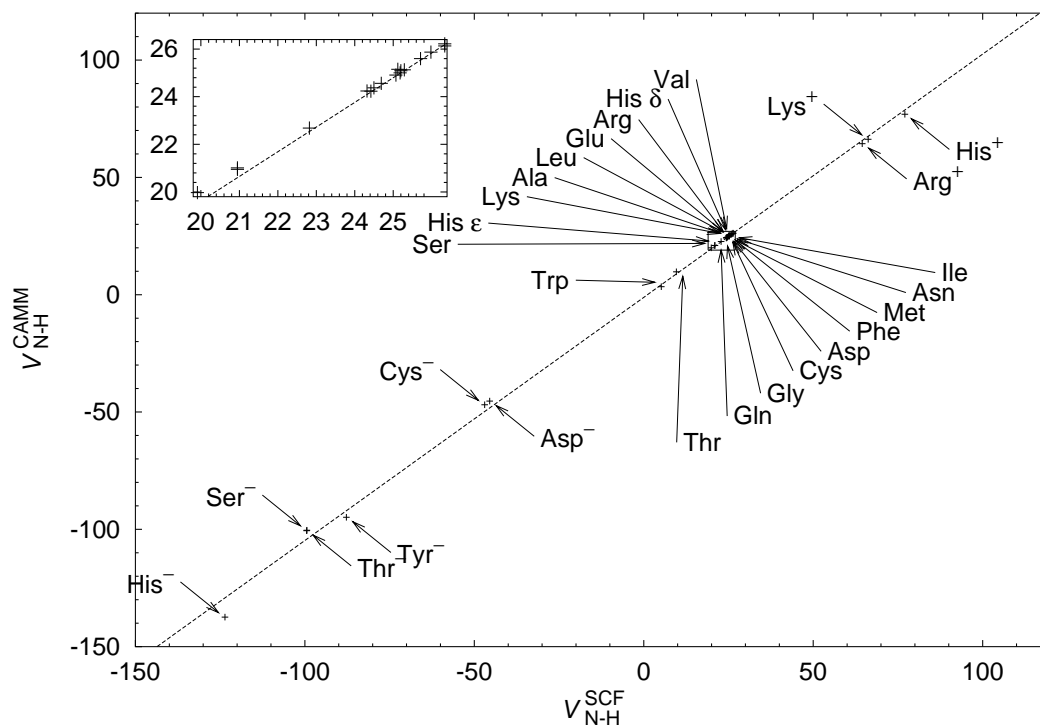
Rysunek 4.1: Pozycje potencjalnego akceptora lub donora wiązania wodorowego do grupy N–H (a) lub C=O (b) łańcucha głównego, na przykładzie diamidu alaniny (odległość 3 Å).

4.1.2 Potencjał elektrostatyczny donorów oraz akceptorów wiązań wodorowych

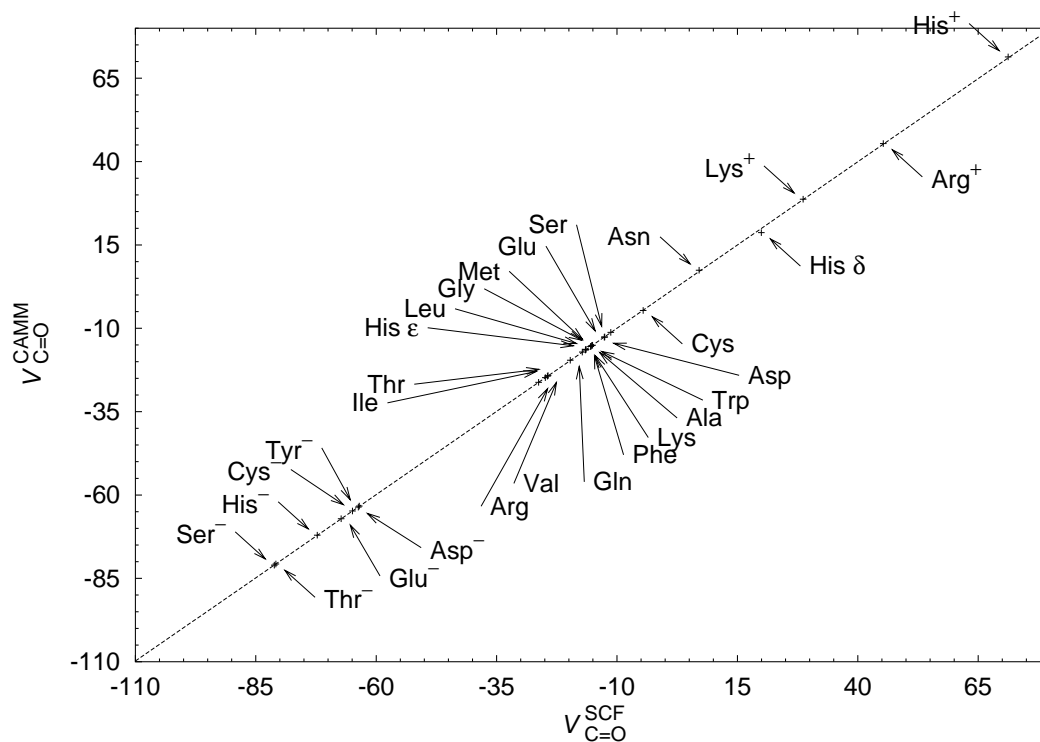
W celu porównania, w skali bezwzględnej, odtwarzania potencjału elektrostatycznego przez CAMM oraz inne współczesne stosowane modele ładunków atomowych, jako przykład testowy wybrano potencjały poszczególnych aminokwasów w pozycji donora/akceptora wiązania wodorowego. Dla wszystkich cząsteczek aminokwasów z biblioteki CAMM wygenerowano współrzędne punktów w pozycjach atomów ciężkich mogących tworzyć wiązanie wodorowe z grupami N–H oraz C=O łańcucha peptydowego, dla odległości w każdym przypadku równej 3 Å (Rys.4.1).

Wartości spodziewane potencjału w tych punktach policzono zarówno metodą Hartree-Focka jak i hybrydowego funkcjonału B3LYP — posłużyły one jako wartości porównawcze. Rysunki 4.2 i 4.3 pokazują znakomitą korelację między potencjałami otrzymanymi przy zastosowaniu atomowego rozwinięcia multipolowego CAMM, a obliczonymi jako wartość spodziewana.

a)

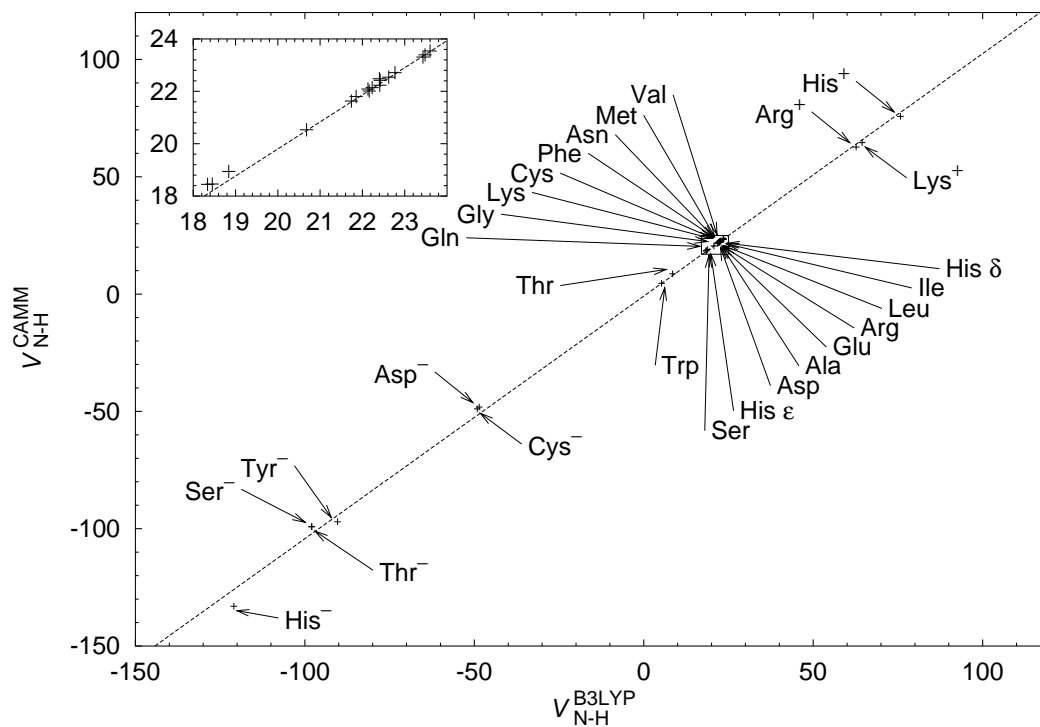


b)

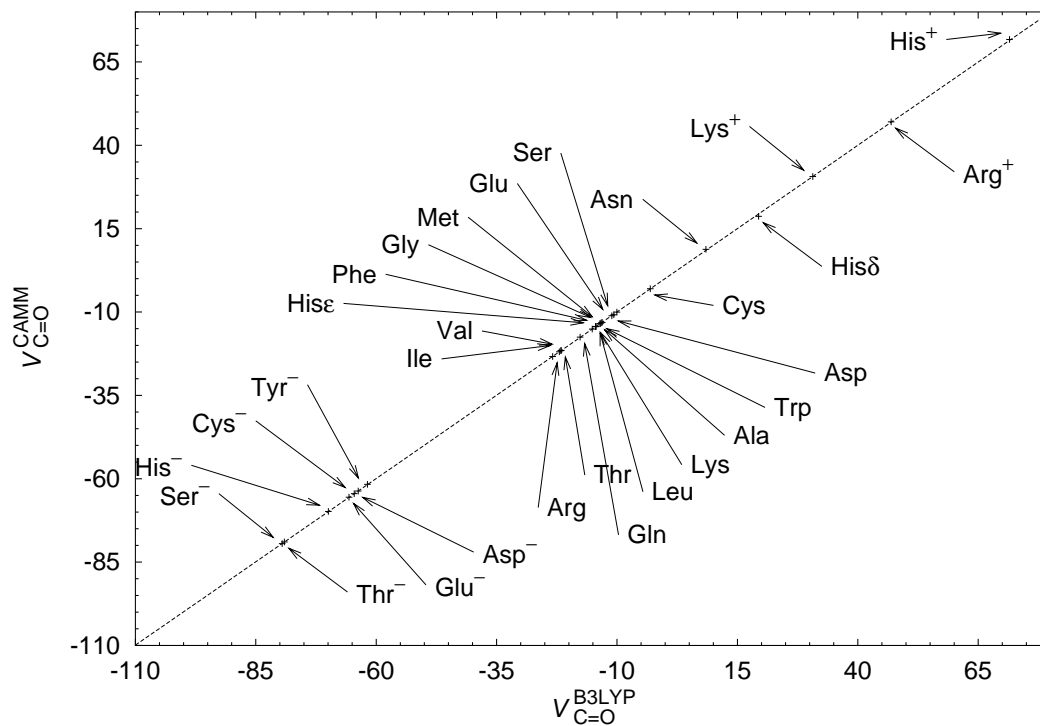


Rysunek 4.2: Korelacja między wartościami spodziewanymi potencjału elektrostatycznego *ab initio* SCF, a potencjałem generowanym przez CAMM(R^{-4}) dla biblioteki aminokwasów: a) dla grupy N–H; b) dla grupy C=O

a)



b)



Rysunek 4.3: Ciąg dalszy rysunku 4.2 — wyniki dla metody B3LYP: a) dla grupy N-H; b) dla grupy C=O

4.1.3 Odtwarzanie rozkładu potencjału na powierzchni cząsteczki

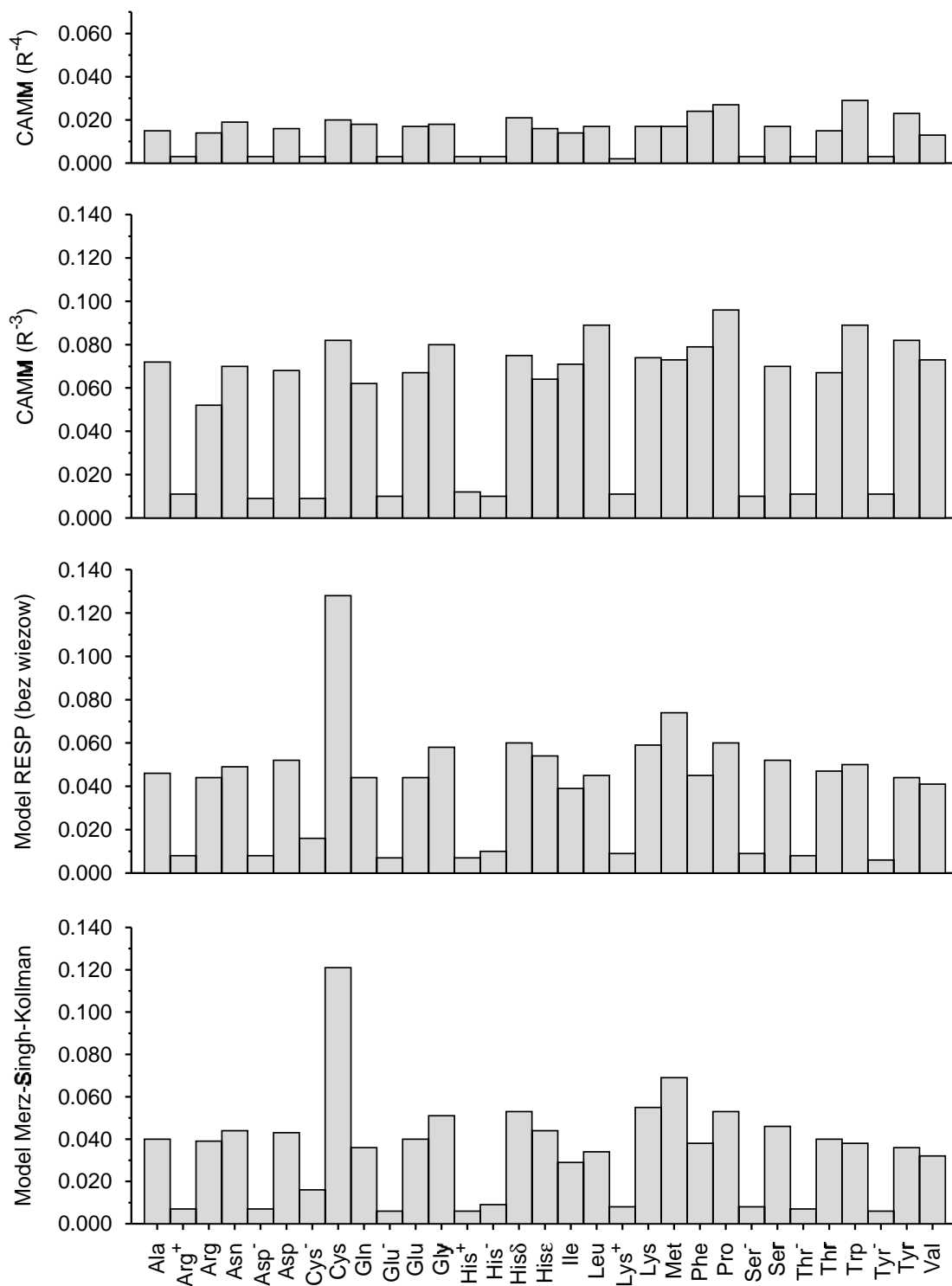
Porównywanie bezpośrednio wartości potencjału elektrostatycznego nie nadaje się do systematycznej analizy, ze względu na arbitralny charakter wyboru badanych punktów wokół cząsteczki. Dlatego do bardziej szczegółowych porównań dokładności różnych modeli zastosowano miarę błędu $RRMS_V$ (Równ. (2.16)) zaproponowaną przez Kollmana i współpracowników [109]. $RRMS_V$ okazuje się być miarą stosunkowo wrażliwą na różnice między wartościami wzorcowymi V_i i przybliżonymi V'_i potencjału, dzięki czemu lepiej nadaje się do mierzenia różnic w dokładności różnych metod. Ponadto, arbitralny charakter wyboru punktów pomiarowych zostaje częściowo zniwelowany przez uśrednienie miary błędu po całej powierzchni cząsteczki.

Miara $RRMS_V$ została użyta do ilościowego porównania dokładności odtwarzania molekularnego potencjału elektrostatycznego (ang. molecular electrostatic potential, MEP) na powierzchniach kontaktowych wszystkich aminokwasów z wygenerowanej biblioteki CAMM przez dwa modele atomowych ładunków punktowych PDC oraz przez CAMM. Obliczenia wykonano dla obydwu wersji biblioteki, tj. uzyskanych metodą Hartree-Focka SCF (Rys. 4.4) oraz przy wykorzystaniu funkcjonału B3LYP (Rys. 4.5). Zakres błędu odtwarzania MEP przez ładunki PDC w większości przypadków mieści się w zakresie wartości $RRMS$ do 0.08; większe błędy, jak dla cysteiny, mogą być spowodowane niemożnością opisu przez punktowy ładunek znacznej anizotropii dużego, mocno polaryzowanego oraz nie ekranowanego atomu siarki. Wyniki dla modeli MSK i RESP można z dużym prawdopodobieństwem traktować jako bliskie górnej granicy jakości modelu uwzględniającego jedynie ładunki atomowe.

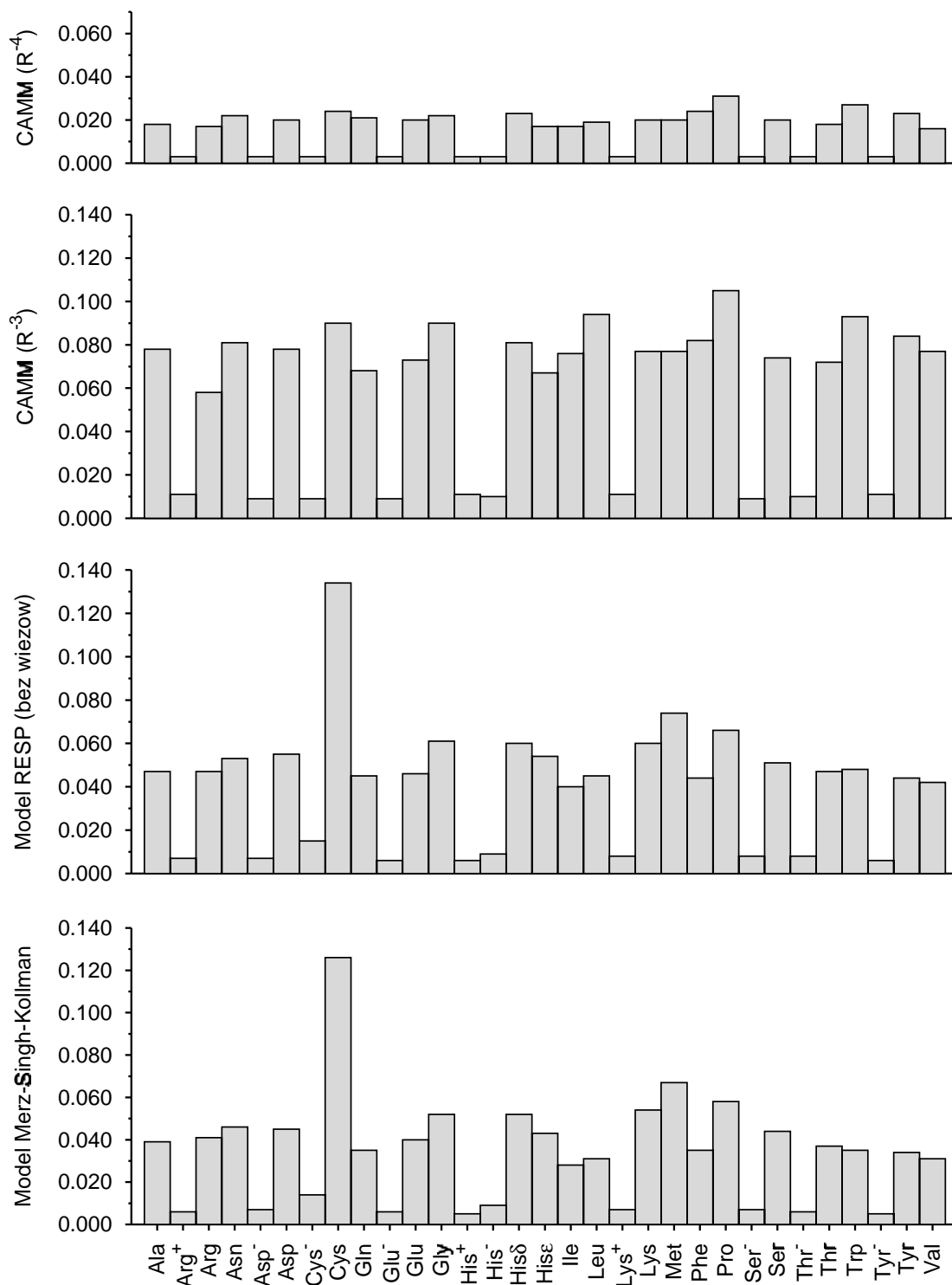
W przypadku dwóch przybliżeń CAMM (Rys. 4.4 i 4.5, wykresy u góry), opis potencjału zakończony na wyrazach $\sim R^{-3}$ (do momentów kwadrupolowych) jest wciąż jeszcze nieco gorszy niż MSK i RESP, jednak nie wykazuje nieoczekiwanych odchyłeń dla aminokwasów zawierających siarkę. Należy też zaznaczyć, że rozwinięcie CAMM startuje tutaj z ładunków Mullikena, które dają błędy $RRMS_V$ rzędu 0.5. Uwzględnienie w opisie CAMM badanych cząsteczek atomowych momentów oktupolowych (i zakończenie rozwinięcia (2.15) na składnikach $\sim R^{-4}$) redukuje błędy opisu potencjału do wartości 2–3-krotnie niższych niż dla metod opartych na monopolach, ale nie jest to nadal żadnym ograniczeniem metody jako takiej.

4.1.4 Wrażliwość modelu CAMM na zmiany konformacji

Analiza odtwarzania elektrostatycznego potencjału cząsteczkowego odpowiada jedynie na pytanie o jakość opisu statycznego, niezaburzonego rozkładu ładunku. Chociaż opis roz-



Rysunek 4.4: Błędy $RRMS_V$ na powierzchniach kontaktowych diamidów aminokwasów, obliczone na poziomie metody SCF/6-31G(d,p).



Rysunek 4.5: Błędy $RRMS_V$ na powierzchniach kontaktowych diamidów aminokwasów, obliczone na poziomie metody B3LYP/6-31G(d,p).

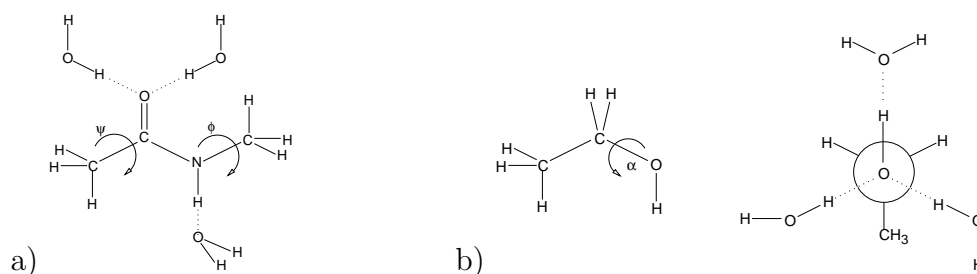
kładu potencjału ma sporo zastosowań, bardziej istotne jest możliwie dokładne odtwarzanie przez model uproszczony energii oddziaływań międzycząsteczkowych. Niestety, w przypadku oddziaływań pojawiają się efekty nie dające się opisać modelem statycznym. Próby uwzględnienia efektów polaryzacyjnych w modelach opartych na ładunkach atomowych, a także w modelu DMA [175] były podejmowane wielokrotnie, jednak z ograniczonym sukcesem. Pojawiło się natomiast kilka analiz przenośności modelu multipolowego nie uwzględniającego opisu polaryzowalności [176–179]. Wnioski płynące z tych prac wskazują na niepokojąco duże deformacje rozkładu ładunku po przeniesieniu rozkładu multipolowego z jednej konformacji do innej. Jedynie ostatnia praca Kocha i Stone’a [179] wskazuje na ograniczoną stosowalność schematu DMA dla odtwarzania oddziaływań międzycząsteczkowych — o ile bariery zmian konformacyjnych są bardzo niskie (rzędu $k_B T$). Ponieważ jednak rozwinięcie DMA ma charakter bardziej zdelokalizowany niż CAMM, wydało się stosowne wykonanie porównawczej analizy tych dwóch modeli.

Ze względu na możliwość porównania z pracą [179], zastosowano w miarę możliwości podobne metody. Podstawowe różnice dotyczyły:

- dostępnego oprogramowania: zamiast optymalizacji położeń oddziałujących cząsteczek programem ORIENT [180], użyto pakietu GAMESS z implementacją metody EFP [14]. W obydwu przypadkach funkcja potencjału przybliżyła człon elektrostatyczny oddziaływaniem rozkładu multipoli DMA, lecz pozostałe człony są różne;
- geometria związanych cząsteczek wody była w naszym przypadku taka sama dla wszystkich konformerów cząsteczki centralnej, aby nie uwzględniać wpływu na energię oddziaływania zaburzeń innych niż zmiany konformacji.

Różnice te nie są na tyle istotne, aby wykluczyć porównanie wyników zwłaszcza, że chodzi raczej o trendy niż o wartości bezwzględne.

Z trzech przykładów badanych w pracy [179] wykorzystano dwa, ponieważ trzeci jako dotyczący rotacji z zerwaniem wiązania π nie może być prawidłowo opisany przybliżeniem o naturze czysto elektrostatycznej. Modelowe cząsteczki, mianowicie etanol i N-metyloacetamid (NMA) (Rys. 4.6) zostały zoptymalizowane metodą Hartree-Focka SCF w bazie 6-31G(d,p) z użyciem pakietu Gaussian 94 [63]. Geometria cząsteczek wody tworzących wiązania wodorowe z grupą peptydową NMA oraz z grupą hydroksylową etanolu (Rys. 4.6) została zoptymalizowana metodą EFP [14] zaimplementowaną w pakiecie GAMESS [62]. Momenty CAMM do oktopolowych włącznie zostały obliczone osobno dla optymalnej geometrii cząsteczki H_2O oraz dla wszystkich badanych konformerów etanolu i NMA, w przedziałach co 15° dla obrotu grupy CH_3 NMA i co 30° dla obrotu C_2H_5 etanolu. Za przykładem Kocha i Stone’a, energie oddziaływań obliczono dwoma sposobami. W



Rysunek 4.6: Cząsteczki a) N-metylo acetamidu (NMA) oraz b) etanolu oddziałujące z cząsteczkami wody. Zaznaczono kąty torsyjne będące przedmiotem studiów przenośności konformacyjnej modeli DMA i CAMM

przybliżeniu „elastycznych” CAMM, dla każdej konformacji użyto CAMM policzonych dla tej konformacji. Energie oddziaływań obliczone tą metodą są oznaczone jako $\Delta E_{\text{flex}}^{\text{CAMM}}$. W przybliżeniu uśrednionych momentów (odpowiednia $\Delta E_{\text{av}}^{\text{CAMM}}$), użyte wartości momentów CAMM były średnią po wszystkich konformacjach. Zastosowane oznaczenia są zgodne z użytymi w pracy [179].

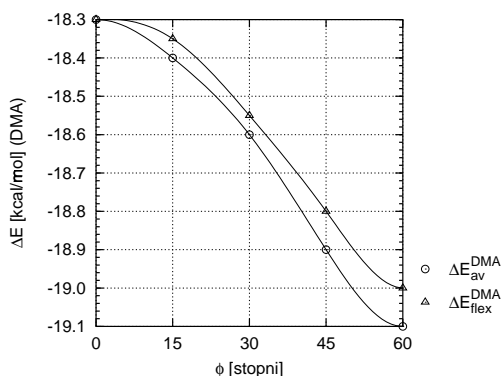
Wyniki porównań zaprezentowane zostały na rysunkach 4.7 i 4.8. Dodatkowo, pokazane są odpowiednie wykresy energii oddziaływań uzyskanych metodą SCF. Łatwo zauważyć, że model CAMM odtwarza zadowalająco zarówno wysokość, jak i kształt krzywych w obydwu badanych przypadkach. Jest to znacząca różnica w porównaniu z modelem DMA, który wydaje się pracować tylko dla bardzo niskich barier rotacji — w przypadku NMA wysokość tej bariery to ok. 0.1 kcal/mol, w porównaniu z ok. 2 kcal/mol dla etanolu. Różnica ta może wynikać ze wspomnianego zdelokalizowanego charakteru momentów atomowych DMA.

Uzyskane wyniki sugerują większy niż dotychczas sądzono zakres przenośności modelu multipolowego [181]. Dlatego w następnym kroku postawione zostały pytania:

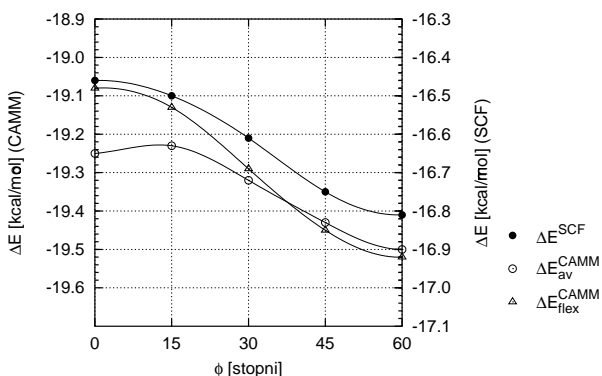
- Czy przenośność konformacyjna CAMM jest zadowalająca także dla wyższych barier rotacji, spotykanych w układach peptydowych?
- Czy model CAMM odtwarza również postacie krzywych energii oddziaływań w funkcji względnego położenia oddziałujących cząsteczek?

Do tego testu wybrano cząsteczkę N'-acetylo, C'-metyloamino diglicyny oddziałującej (przez wiązanie wodorowe) z cząsteczką wody (Rys. 4.9). Porównawcze krzywe energii oddziaływań z płaskim (all-trans) konformerem dipeptydu w funkcji obrotu cząsteczek H₂O wokół osi odpowiednich wiązań wodorowych zostały obliczone metodą HF SCF/6-31G(d,p) z uwzględnieniem korekty BSSE [26]. Rozkłady CAMM obliczono dla zestawu konformacji peptydu modelowego różniących się wartościami kąta ψ . Wybrane wartości pokrywają cały

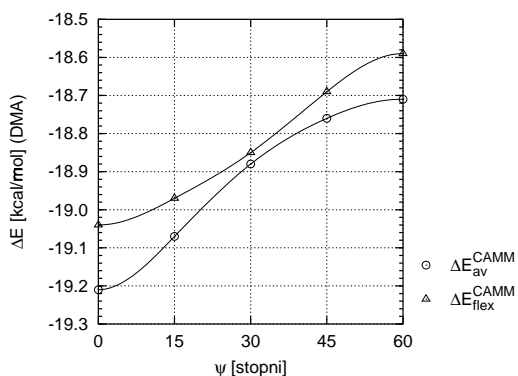
a) DMA



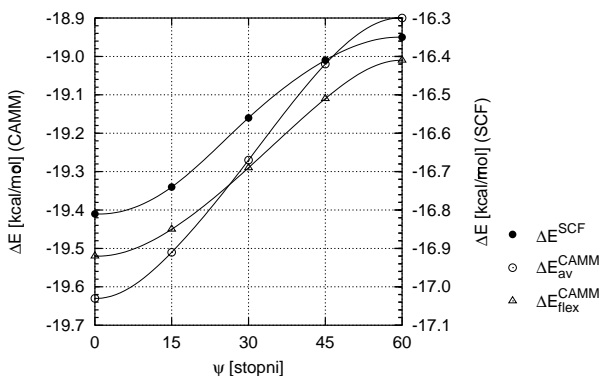
CAMM



b) DMA

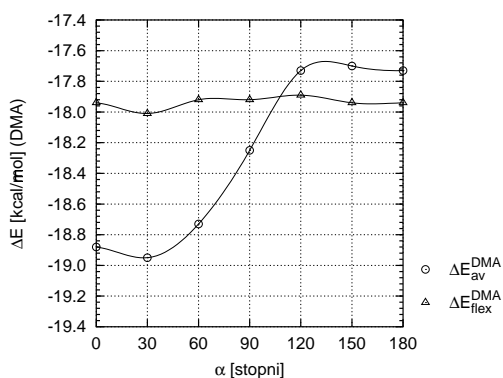


CAMM

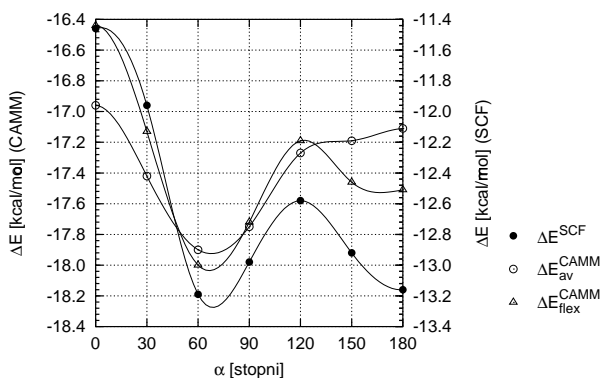


Rysunek 4.7: Porównanie przenośności konformacyjnej modeli DMA i CAMM w funkcji kątów a) ϕ oraz b) ψ w cząsteczce NMA (Rys. 4.6a)

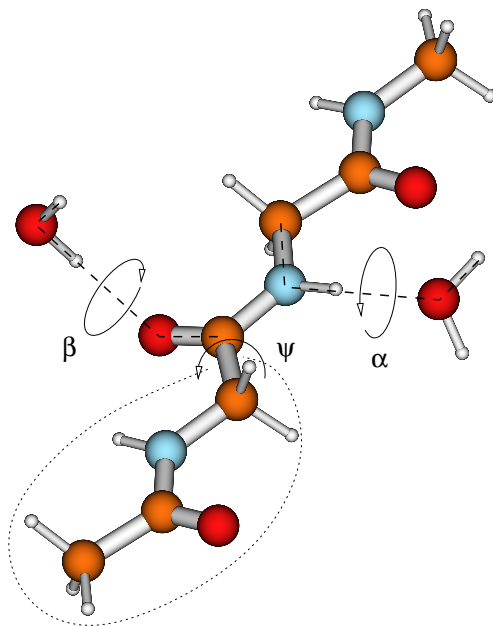
DMA



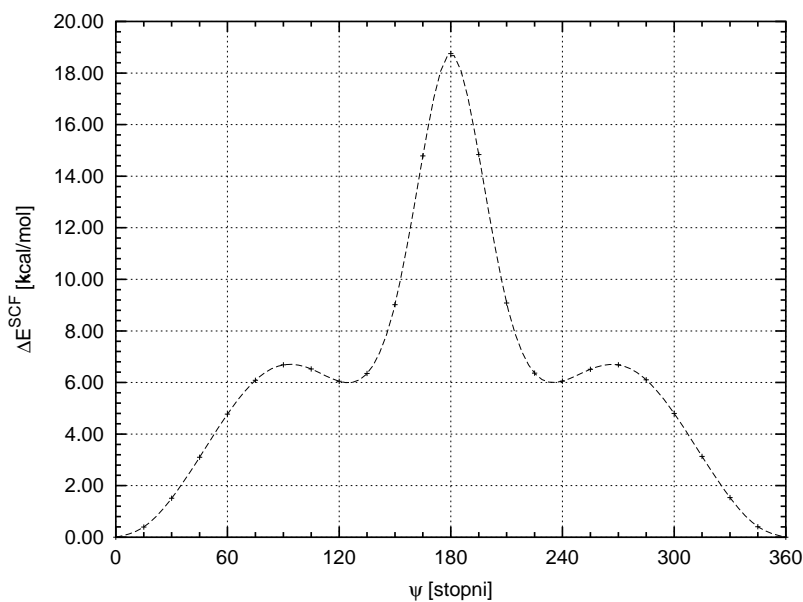
CAMM



Rysunek 4.8: Porównanie przenośności konformacyjnej modeli DMA i CAMM na przykładzie rotacji grupy C_2H_5 etanolu (Rys. 4.6b).



Rysunek 4.9: Układ modelowy do badań przenośności konformacyjnej CAMM: N'-acetylo, C'-metyloamino diglicyna tworząca wiązania wodorowe z cząsteczką wody przez grupę N-H lub C=O. Zaznaczono kąty rotacji cząsteczek wody (α , β) oraz kąt definiujący konformację dipeptydu (ψ).



Rysunek 4.10: Bariera rotacji dla kąta torsyjnego ψ w N'-acetylo, C'-metyloamino diglicynie (por. Rys. 4.9).

zakres obrotu, włączając w to konformacje leżące na obszarach „zakazanych” diagramu Ramachandrana dla poliglicyny [182]. Dodatkowo, rysunek 4.10 prezentuje wartości naprężeń w (nierelaksowanej) cząsteczce modelowej diglicyny w funkcji kąta ψ .

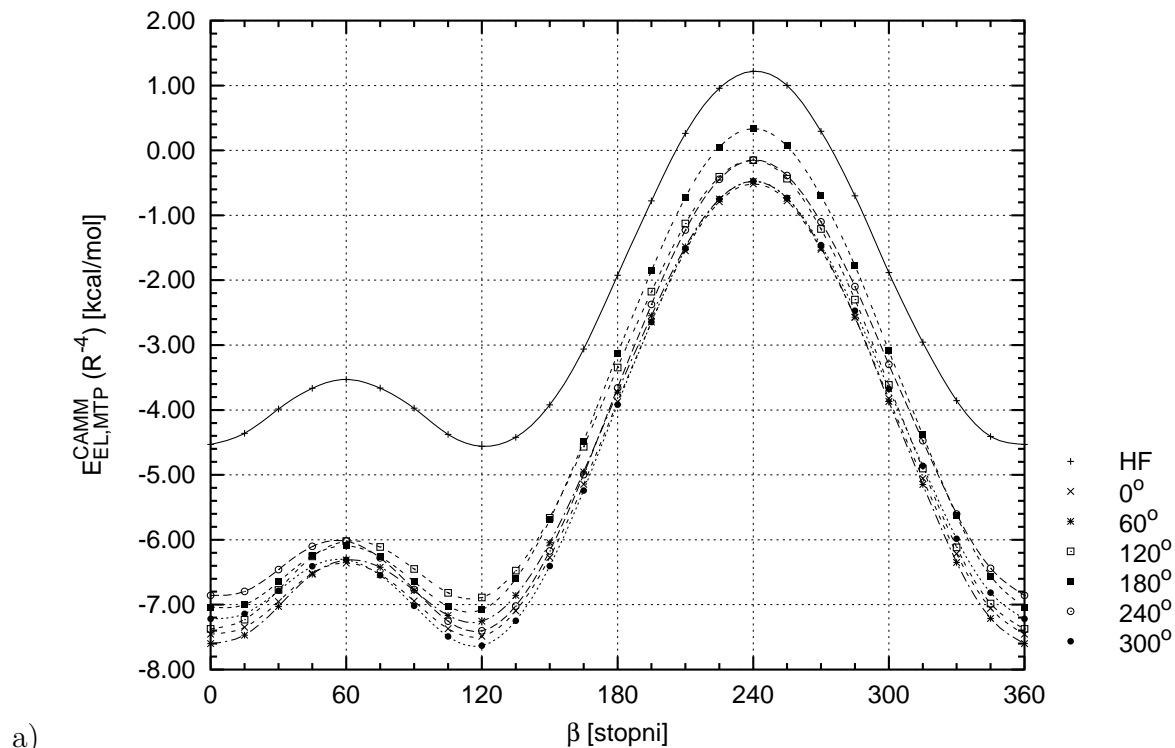
Wyniki testu zebrane są na rysunkach 4.11 a) i b), odpowiednio dla wiązania z grupą N–H lub C=O peptydu. W przypadku wiązania $\text{H}_2\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$, które jest silniejsze i bardziej kierunkowe, zgodność krzywych między sobą i w porównaniu z wynikami uzyskanymi metodą SCF jest znakomita. Dla wiązania $\text{HO}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$, odtwarzanie krzywej *ab initio* wydaje się nieco gorsze, chociaż pozycje ekstremów i wysokość bariery rotacji są względnie dobrze reprodukowane. Należy jednak zauważyć, że w obydwu przypadkach przedział różnic jest taki sam i nie przekracza 1 kcal/mol. Jest to błąd mniejszy, niż wynikający z przybliżenia energii oddziaływań przez $E_{\text{EL},\text{MTP}}^{(1)}$.

Podsumowując można stwierdzić, że model CAMM wydaje się oferować lepszą przenośność konformacyjną niż wcześniej badany DMA, przynajmniej w zastosowaniu do obliczeń oddziaływań międzycząsteczkowych. Warto zauważyć, że wyniki te otrzymano dla układów modelowych eliminujących praktycznie zaburzenia inne, niż zmiany konformacji. Dla wybranych układów z długimi pojedynczymi wiązaniami uzyskano nawet bardziej obiecujące wyniki [126]. Dlatego za istotne uznano wykonanie analizy przenośności multipolowego opisu rozkładu ładunku w szerszym zakresie [181].

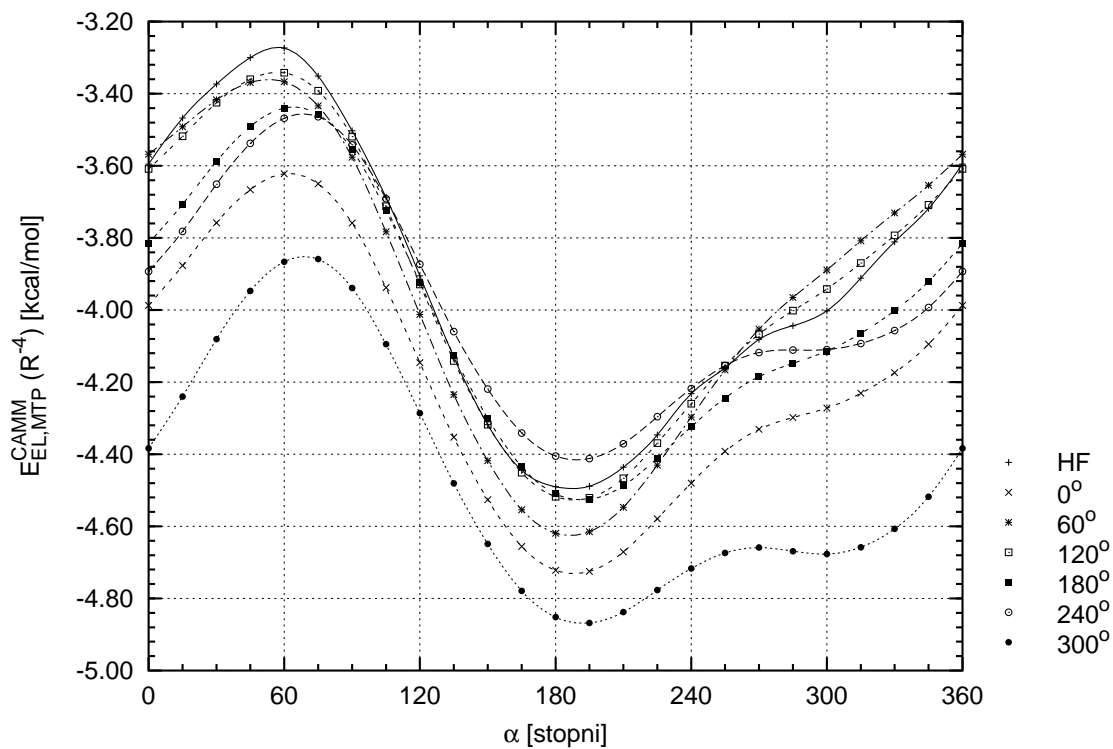
4.2 Analiza międzycząsteczkowej przenośności CAMM

Wyższego rzędu efekty indukcyjne, polaryzacyjne oraz korelacyjne, odpowiedzialne za nieprzenośność uproszczonych modeli molekularnego rozkładu ładunku, wymagają zastosowania możliwie dokładnego modelu nieempirycznego, i z tego względu są ciągle niedostępne obliczeniowo dla dużych układów. Ponadto, ze względu na nieaddytywny charakter, trudno jest zaproponować dla nich ogólny i przenośny model. Takie próby są wprawdzie podejmowane [175, 183], ale proponowane rozwiązania nie doczekały się jeszcze powszechnego zastosowania. Ich wspólną cechą jest wykorzystanie do opisu efektów wyższego rzędu polaryzowalności atomowych.

Ewentualne uzupełnienie multipolowego modelu rozkładu ładunku o model polaryzowalności, i konsekwentnie hiperpolaryzowalności atomowych lub wielocentrowych, wydaje się być jeszcze trudniejsze do osiągnięcia. W wielu zastosowaniach może okazać się wystarczające oszacowanie błędów popełnianych zarówno przez całkowite zaniedbanie polaryzowalności, jak i bardziej szczegółowa ocena błędów na różnych poziomach rozwinięcia szeregu multipolowego. Analiza taka powinna także dać lepsze pojęcie o naturze i wielkości błędów przenośności konformacyjnej, jako będącej szczególnym (ograniczonym) przypad-



a)



b)

Rysunek 4.11: Odtwarzanie krzywych energii oddziaływań międzycząsteczkowych przez CAMM obliczone dla różnych konformacji diglicyny: a) wiązanie wodorowe $\text{H}_2\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ b) wiązanie wodorowe $\text{HO}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$.

kiem przenośności między różnymi otoczeniami molekularnymi.

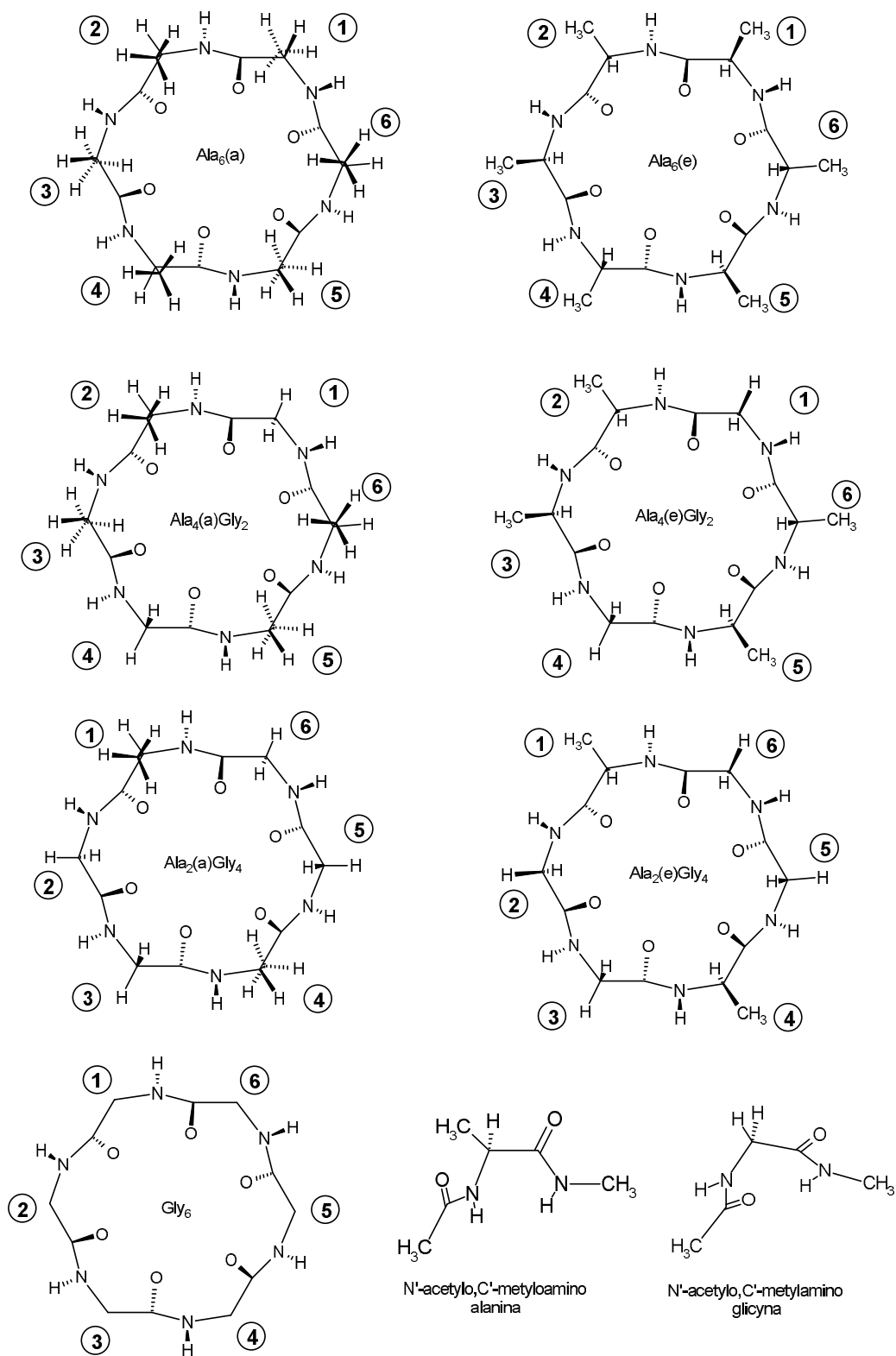
4.2.1 Przeność CAMM między cząsteczkami o podobnej topologii

Porównywanie energii oddziaływań jako miara dokładności modelu rozkładu ładunku pozwala określić błąd wynikający z nieprzenośności opisu multipolowego *łącznie* z błędami zaniedbania penetracji, wymiany i wkładów wyższego rzędu. Do celów analizy specyficznemu błędów przenośności, słuszniejsze wydaje się porównywanie odtwarzania potencjału elektrostatycznego. Z tego samego względu, dla zapewnienia jednoznaczności mierzonych błędów, wybrano do badań struktury między którymi przenoszenie fragmentów nie wiąże się ze zmianami konformacji, a reszkowe ładunki na wyciętym z cząsteczki fragmencie są zerowe lub zanedbywalnie małe.

Wykorzystane do analizy struktury, cykliczne heksapeptydy Ala₆, Ala₄Gly₂, Ala₂Gly₄ oraz Gly₆ zostały zdefiniowane w formie macierzy Z z zachowaniem symetrii S₆ dla Gly₆, C_{3v} dla Ala₆ (w rzeczywistości (L-Ala D-Ala)₃, oraz C_i dla pozostałych. Pierścienie zawierające reszty alaniny wykazują izomerię konformacyjną, mianowicie grupy metylowe alaniny mogą być wszystkie aksjalne (a) lub ekwatorialne (e) w stosunku do płaszczyzny pierścienia, dlatego zbudowano obie formy. Wszystkie cząsteczki (pokazane na Rys. 4.12) zostały zoptymalizowane na tym samym poziomie co biblioteka aminokwasów, tj. metodą LCAO MO SCF w bazie 6-31G(d,p). Dzięki zachowaniu symetrii, udało się zredukować do minimum reszkowe ładunki na wyciętych z pierścieni przenoszonych fragmentach. Porównanie wartości ładunków reszkowych na fragmentach cykloheksapeptydów oraz na resztach alaniny i glicyny z biblioteki CAMM prezentuje Tabela 4.1.

Opisany zestaw struktur posłużył do analizy przenośności międzycząsteczkowej CAMM na dwóch poziomach, tj. między otoczeniami molekularnymi o stosunkowo wysokim podobieństwie oraz między cząsteczkami o różnej budowie. W pierwszym przypadku, fragmentów pierścieni Ala₆ i Gly₆ użyto do budowy heteromerów Ala_nGly_{6-n}. W tym kontekście, ładunki reszkowe na przenoszonych resztach są zerowe, a zmiany w rozkładzie ładunku otoczenia względnie niewielkie. Z podobną sytuacją mielibyśmy do czynienia w układach o wysokiej symetrii, w substancjach krystalicznych lub o budowie periodycznej (rdzeń α-helisy polipeptydu, DNA itp.), o ile fragmenty strukturalne byłyby policzone w podobnym otoczeniu.

Wyniki analizy zebrane są w Tabeli 4.2. W pierwszej części (4.2 a), prezentowane są rezultaty odtwarzania MEP generowanego przez oryginalne rozwinięcie CAMM, zakończone na tym samym wyrazie. Można zauważyć stosunkowo lepszą przenośność na poziomie ła-



Rysunek 4.12: Struktury symetrycznych cyklicznych heksapeptydów Ala_nGly_{6-n} oraz N' -acetylo, C' -metyloaminowych pochodnych alaniny i glicyny, wykorzystane do badań przenośności międzycząsteczkowej CAMM.

| Reszta | Ala ₆ | | Ala ₄ Gly ₂ | | Ala ₂ Gly ₄ | | Gly ₆ |
|---------------------------|------------------|--------|-----------------------------------|---------|-----------------------------------|---------|------------------|
| | (a) | (e) | (a) | (e) | (a) | (e) | |
| Ala 1 | 0.0000 | 0.0000 | | | 0.0047 | 0.0035 | |
| Ala 2 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0068 | 0.0027 | | | |
| Ala 3 | 0.0000 | 0.0000 | -0.0023 | 0.0004 | | | |
| Gly 1 | | | -0.0044 | -0.0032 | | | 0.0000 |
| Gly 2 | | | | | -0.0065 | -0.0029 | 0.0000 |
| Gly 3 | | | | | 0.0018 | -0.0004 | 0.0000 |
| Glicyna z biblioteki CAMM | | | | | | | -0.0463 |
| Alanina z biblioteki CAMM | | | | | | | -0.0358 |

Tablica 4.1: Ładunki resztkowe przenoszonych fragmentów danych CAMM alaniny i glicyny. Symbolami (a) oraz (e) oznaczono odpowiednio aksjalne i ekwatorialne formy cyklopeptydów zawierających alaninę. Numeracja jak na Rys. 4.12.

dunków (Mullikena), co można wyjaśnić bardzo małymi różnicami w ich wartościach (por. Tabela 4.1). Nieco większe błędy pojawiają się przy uwzględnieniu kolejnych wyrazów (Równ. (2.15)), co może sugerować gorszą przenośność wyższych momentów elektrostatycznych. Równie prawdopodobnym wyjaśnieniem może być jednak fakt redukcji sumarycznych ładunków na przenoszonych fragmentach dzięki odpowiedniej symetrii cząsteczek; podobny efekt raczej nie jest równie wyraźny w przypadku wyższych momentów, opisujących lokalną anizotropię rozkładu ładunku. Być może godnym spostrzeżenia jest fakt, że najbardziej wrażliwe na różnice w otoczeniu molekularnym okazały się atomowe momenty dipolowe; uwzględnienie kolejnych członów praktycznie nic już nie wnosi. Prawdopodobnie wynika to z ich krótkozasięgowego charakteru, a więc i małej wrażliwości na stosunkowo odległe zmiany rozkładu ładunku.

Druga część Tabeli 4.2 (b) prezentuje błędy odtwarzania rozkładu wartości spodziewanych potencjału elektrostatycznego, odpowiada więc rzeczywistej jakości modelu. Dokładność opisu MEP jest tutaj zbieżna z rozwinięciem szeregu CAMM, i przy uwzględnieniu momentów oktupolowych staje się podobna lub lepsza niż osiągnięta przez oryginalny rozkład CAMM do momentów kwadrupolowych włącznie (Tabela 4.3). Przenośność modelu jest więc w tym przypadku zupełnie zadowalająca. Co równie ważne, precyzja odtwarzanie MEP przez przeniesione CAMM systematycznie wzrasta z uwzględnieniem kolejnych wyrazów rozwinięcia, co stwarza nadzieję na dalszą poprawę jakości modelu w razie potrzeby. Przenośność modelu CAMM między podobnymi, symetrycznymi układami wykorzystano jak dotychczas w modelowaniu zeolitów [184].

a) Porównanie względem oryginalnego rozwinięcia CAMM

| Porównanie na poziomie: | Ala ₄ Gly ₂ | | Ala ₂ Gly ₄ | |
|-------------------------|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|
| | (a) | (e) | (a) | (e) |
| $R^{-1} - R^{-1}$ | 0.025 | 0.011 | 0.024 | 0.012 |
| $R^{-2} - R^{-2}$ | 0.100 | 0.025 | 0.101 | 0.026 |
| $R^{-3} - R^{-3}$ | 0.110 | 0.022 | 0.099 | 0.024 |
| $R^{-4} - R^{-4}$ | 0.109 | 0.023 | 0.099 | 0.024 |

b) Porównanie względem wartości spodziewanych potencjału elektrostatycznego (MEP)

| Porównanie na poziomie: | Ala ₄ Gly ₂ | | Ala ₂ Gly ₄ | |
|-------------------------|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|
| | (a) | (e) | (a) | (e) |
| $R^{-1} - \text{MEP}$ | 0.354 | 0.394 | 0.355 | 0.371 |
| $R^{-2} - \text{MEP}$ | 0.400 | 0.287 | 0.335 | 0.278 |
| $R^{-3} - \text{MEP}$ | 0.152 | 0.102 | 0.134 | 0.091 |
| $R^{-4} - \text{MEP}$ | 0.116 | 0.034 | 0.104 | 0.033 |

Tablica 4.2: Błędy RRMS_V odtwarzania wartości spodziewanych MEP na powierzchniach kontaktowych symetrycznych cyklicznych heksapeptydów Ala_nGly_{6-n} przez rozwinięcie CAMM zbudowane z fragmentów Ala₆ i Gly₆.

| Porównanie na poziomie: | Ala ₆ | | Ala ₄ Gly ₂ | | Ala ₂ Gly ₄ | | Gly ₆ |
|-------------------------|------------------|-------|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|------------------|
| | (a) | (e) | (a) | (e) | (a) | (e) | |
| R^{-1} | 0.348 | 0.420 | 0.349 | 0.397 | 0.351 | 0.372 | 0.351 |
| R^{-2} | 0.467 | 0.301 | 0.386 | 0.283 | 0.322 | 0.275 | 0.272 |
| R^{-3} | 0.115 | 0.109 | 0.100 | 0.101 | 0.086 | 0.089 | 0.071 |
| R^{-4} | 0.036 | 0.026 | 0.032 | 0.025 | 0.028 | 0.024 | 0.024 |

Tablica 4.3: Błędy RRMS_V odtwarzania wartości spodziewanych MEP na powierzchniach kontaktowych symetrycznych cyklicznych heksapeptydów Ala₆, Ala_nGly_{6-n} i Gly₆ przez rozwinięcie CAMM.

| Porównanie na poziomie: | Ala ₆ | | Ala ₄ Gly ₂ | | Ala ₂ Gly ₄ | | Gly ₆ |
|----------------------------|------------------|-------|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|------------------|
| | (a) | (e) | (a) | (e) | (a) | (e) | |
| $R^{-1} — R^{-1}$ | 1.544 | 1.225 | 1.570 | 1.350 | 1.577 | 1.477 | 1.587 |
| $R^{-2} — R^{-2}$ | 1.595 | 1.954 | 1.820 | 2.080 | 2.058 | 2.206 | 2.317 |
| $R^{-3} — R^{-3}$ | 1.933 | 1.780 | 1.986 | 1.880 | 2.029 | 1.986 | 2.078 |
| $R^{-4} — R^{-4}$ | 1.891 | 1.804 | 1.966 | 1.903 | 2.030 | 2.007 | 2.099 |
| $R^{-4} — \text{MEP}$ | 1.893 | 1.803 | 1.965 | 1.903 | 2.030 | 2.003 | 2.099 |

Tablica 4.4: Błędy RRMS_V przenośności fragmentów modelu rozkładu ładunku CAMM między otoczeniami cząsteczkowymi o niewielkim podobieństwie.

4.2.2 Przenośność CAMM między różnymi otoczeniami molekularnymi

Przenośność fragmentów rozkładu ładunku między niezbyt podobnymi cząsteczkami jest bardziej problematyczna, jednak niezbędna, jeśli mamy na uwadze zastosowanie do budowy makrocząsteczek. Dla porównania z poprzednimi wynikami, przeprowadzono testy dla odtwarzania MEP na powierzchniach cykloheksapeptydów przez fragmenty rozkładu CAMM obliczone dla optymalnych geometrii diamidów alaniny i glicyny (Rys. 4.12). W tym przypadku, przenoszone fragmenty mają o rząd większe sumaryczne ładunki resztkowe (Tabela 4.1), będące wynikiem polaryzacji rozkładu ładunku fragmentu, zwłaszcza wiązań peptydowych, dzielonych przy odrzucaniu grup blokujących. Mimo iż wartości tych ładunków nie wydają się duże, to jednak wielkość błędów odtwarzania MEP w tym przypadku raczej wyklucza zastosowania praktyczne ($\text{RRMS}_V > 1$, Tabela 4.4).

Najbardziej prawdopodobnym powodem tak złej przenośności są różnice na poziomie ładunków, co jest sugerowane przez duże wartości błędów RRMS_V w Tabeli 4.4 oraz ich niewrażliwość na rozszerzanie rozwinięcia multipolowego. Ponieważ jednak arbitralność analizy populacyjnej (Równ. (2.10)) w jednakowym stopniu dotyczy wszystkich momentów multipolowych, słuszne wydało się przeprowadzenie szczegółowej analizy wielkości błędów pojawiających się na każdym poziomie rozwinięcia CAMM. W tym celu przeprowadzono testy odtwarzania MEP przez rozwinięcie CAMM skonstruowane z momentów atomowych pochodzących częściowo z oryginalnego opisu CAMM cząsteczek cykloheksapeptydów, a częściowo z rozwinięcia CAMM dla odpowiednich atomów N'-acetylo, C'-metyloaminowych pochodnych alaniny i glicyny. Podmienienie ładunków, dipoli etc. na oryginalne niweluje błędy na ich poziomie, pozwalając ocenić błąd wprowadzany przez przeniesione momenty wyższego rzędu. Wyniki zebrano w Tabeli 4.5. Rzeczywiście naj-

bardziej znaczące błędy pojawiają się na poziomie ładunków, jednak mniejszego udziału wyższych momentów nie można przypisać ich lepszej przenośności, lecz raczej krótkozasięgowemu charakterowi. Przeciwnie niż przy przenoszeniu fragmentów strukturalnych między podobnymi cząsteczkami, uwzględnienie w opisie MEP kolejnych momentów nie poprawia dokładności przeniesionych CAMM. Można jedynie stwierdzić, że problem z przenośnością w jednakowym stopniu dotyczy wszystkich poziomów rozwinięcia CAMM. Zapewnienie zadowalającej jakości modelu wymagałoby adaptacji do docelowego otoczenia co najmniej na poziomach atomowych ładunków, momentów dipolowych i kwadrupolowych (uwzględnienie poprawnych atomowych momentów dipolowych nie daje istotnej poprawy wyników; wprawdzie zakres błędów jest węższy, ale tylko dla niektórych przypadków).

Konstrukcja polaryzowalnego modelu wyższych atomowych momentów multipolowych byłaby z pewnością wartościowym osiągnięciem. Jednakże próba budowy takiego modelu wymaga wciąż intensywnych badań, ponieważ parametryczny opis polaryzowalności nie jest łatwy, o czym świadczy stosunkowo powolny rozwój odpowiednich metod na poziomie ładunków atomowych [115–117, 183]. W niniejszej pracy podjęto jednak wysiłek zmierzający do przynajmniej częściowej poprawy przenośności.

Analiza wartości ładunków na odpowiadających sobie atomach w przenoszonym i docelowym rozkładzie CAMM wykazuje bardzo małe różnice, a całkowite ładunki fragmentów różnią się zaledwie o wartości rzędu 0.04 a.u. Można było zatem podejrzewać, że poprawę przenośności można osiągnąć korygując ładunek sumaryczny fragmentu. W analizowanym przypadku jest to szczególnie proste, jako że reszty alaniny i glicyny w symetrycznych cyklopeptydach mają sumaryczne ładunki równe zeru lub bardzo małe. Wypróbowano zatem kilka arbitralnych metod korekty do zera całkowitego ładunku przenoszonych fragmentów. W dwóch pierwszych, modyfikowano ładunki atomowe o taką samą wartość — albo na wszystkich atomach, albo z wyłączeniem bocznych grup CH₃ reszt alaniny. W pozostałych dwóch metodach modyfikacja ładunku była proporcjonalna do jego wartości bezwzględnej. Wyniki zebrane są w Tabeli 4.6.

Wyniki testu potwierdzają, że podstawowym źródłem dużych błędów prezentowanych w Tabeli 4.4 są nieprawidłowe całkowite ładunki przenoszonych fragmentów, a nie wartości poszczególnych ładunków atomowych. Wszystkie cztery metody korekty dają bardzo podobne wyniki, a poprawa jest na tyle duża, że największy wkład do sumarycznego błędu mają teraz przeniesione momenty dipolowe. Stwarzało to nadzieję, że w przypadku wyższych momentów multipolowych, korekta całkowitych momentów elektrostatycznych fragmentu może też przynieść poprawę przenośności. Podstawową trudnością jest jednak określenie *a priori*, jaki sumaryczny moment elektrostatyczny będzie miał przenoszony fragment w docelowym otoczeniu. To samo dotyczy wprawdzie i całkowitych ładunków,

| Porównanie na poziomie: | Ala ₆ | | Ala ₄ Gly ₂ | | Ala ₂ Gly ₄ | | Gly ₆ |
|--|------------------|-------|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|------------------|
| | (a) | (e) | (a) | (e) | (a) | (e) | |
| I. Błędy nieprzeñości na poziomie ładunków | | | | | | | |
| $R^{-1} — R^{-1}$ | 1.544 | 1.225 | 1.570 | 1.350 | 1.577 | 1.477 | 1.587 |
| II. Przeniesione CAMM z oryginalnymi ładunkami | | | | | | | |
| $R^{-2} — R^{-2}$ | 0.204 | 0.416 | 0.164 | 0.333 | 0.127 | 0.241 | 0.119 |
| $R^{-3} — R^{-3}$ | 0.161 | 0.465 | 0.142 | 0.389 | 0.155 | 0.303 | 0.196 |
| $R^{-4} — R^{-4}$ | 0.147 | 0.460 | 0.135 | 0.385 | 0.149 | 0.299 | 0.191 |
| $R^{-4} — MEP$ | 0.146 | 0.459 | 0.134 | 0.381 | 0.145 | 0.294 | 0.186 |
| III. Przeniesione CAMM z oryginalnymi ładunkami i dipolami | | | | | | | |
| $R^{-3} — R^{-3}$ | 0.148 | 0.150 | 0.142 | 0.157 | 0.135 | 0.150 | 0.129 |
| $R^{-4} — R^{-4}$ | 0.122 | 0.163 | 0.127 | 0.166 | 0.130 | 0.156 | 0.131 |
| $R^{-4} — MEP$ | 0.114 | 0.153 | 0.118 | 0.155 | 0.121 | 0.146 | 0.122 |
| IV. Przeniesione tylko momenty oktupolowe | | | | | | | |
| $R^{-4} — R^{-4}$ | 0.058 | 0.076 | 0.054 | 0.071 | 0.056 | 0.067 | 0.063 |
| $R^{-4} — MEP$ | 0.068 | 0.064 | 0.061 | 0.063 | 0.059 | 0.063 | 0.062 |
| V. Dokładność oryginalnego rozkładu CAMM | | | | | | | |
| $R^{-4} — MEP$ | 0.036 | 0.026 | 0.032 | 0.025 | 0.028 | 0.024 | 0.024 |

Tablica 4.5: Błędy przeñości $RRMS_V$ CAMM między różnymi cząsteczkami zanalizowane na poziomie poszczególnych momentów multipolowych, dzięki podmianie części rozwinięcia na oryginalne.

ale w badanym przypadku były one niewielkie lub równe zeru (Tabela 4.1). Dlatego zbadano raczej efekt takiej poprawki, która odtwarza oryginalne całkowite wartości momentów elektrostatycznych fragmentu (tj. sprzed korekty ładunków). W zastosowanej metodzie rekurencyjnie obliczano różnicę tensorów sumarycznych momentów elektrostatycznych po i przed korektą na niższym poziomie, wynik dzielono przez liczbę atomów fragmentu i dodawano do tensorów atomowych (po transformacji do lokalnych układów współrzędnych). Niestety, sposób ten nie prowadzi do systematycznego polepszenia przeñości CAMM (Tabela 4.7).

| Porównanie na poziomie: | Ala ₆ | | Ala ₄ Gly ₂ | | Ala ₂ Gly ₄ | | Gly ₆ |
|---|------------------|-------|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|------------------|
| | (a) | (e) | (a) | (e) | (a) | (e) | |
| I. Korekta wszystkich ładunków atomowych o stałą | | | | | | | |
| $R^{-1} — R^{-1}$ | 0.155 | 0.069 | 0.136 | 0.091 | 0.167 | 0.095 | 0.035 |
| $R^{-2} — R^{-2}$ | 0.170 | 0.478 | 0.197 | 0.279 | 0.194 | 0.382 | 0.157 |
| $R^{-3} — R^{-3}$ | 0.153 | 0.510 | 0.238 | 0.330 | 0.219 | 0.421 | 0.231 |
| $R^{-4} — R^{-4}$ | 0.143 | 0.505 | 0.231 | 0.325 | 0.210 | 0.416 | 0.225 |
| $R^{-4} — MEP$ | 0.146 | 0.504 | 0.227 | 0.320 | 0.210 | 0.414 | 0.219 |
| II. Korekta o stałą ładunków N, H, C _α , H _α , C i O | | | | | | | |
| $R^{-1} — R^{-1}$ | 0.167 | 0.066 | 0.130 | 0.082 | 0.164 | 0.086 | |
| $R^{-2} — R^{-2}$ | 0.182 | 0.393 | 0.198 | 0.246 | 0.199 | 0.321 | |
| $R^{-3} — R^{-3}$ | 0.181 | 0.433 | 0.241 | 0.304 | 0.229 | 0.369 | |
| $R^{-4} — R^{-4}$ | 0.170 | 0.426 | 0.234 | 0.299 | 0.220 | 0.364 | |
| $R^{-4} — MEP$ | 0.170 | 0.425 | 0.230 | 0.294 | 0.219 | 0.361 | |
| III. Proporcjonalna korekta wszystkich ładunków | | | | | | | |
| $R^{-1} — R^{-1}$ | 0.147 | 0.062 | 0.127 | 0.086 | 0.158 | 0.090 | 0.026 |
| $R^{-2} — R^{-2}$ | 0.177 | 0.433 | 0.186 | 0.244 | 0.192 | 0.341 | 0.127 |
| $R^{-3} — R^{-3}$ | 0.160 | 0.468 | 0.225 | 0.300 | 0.214 | 0.385 | 0.209 |
| $R^{-4} — R^{-4}$ | 0.149 | 0.462 | 0.217 | 0.295 | 0.204 | 0.379 | 0.202 |
| $R^{-4} — MEP$ | 0.150 | 0.461 | 0.213 | 0.290 | 0.204 | 0.377 | 0.196 |
| IV. Proporcjonalna korekta ładunków N, H, C _α , H _α , C i O | | | | | | | |
| $R^{-1} — R^{-1}$ | 0.149 | 0.070 | 0.123 | 0.084 | 0.154 | 0.091 | |
| $R^{-2} — R^{-2}$ | 0.184 | 0.386 | 0.186 | 0.226 | 0.196 | 0.308 | |
| $R^{-3} — R^{-3}$ | 0.173 | 0.426 | 0.225 | 0.287 | 0.217 | 0.357 | |
| $R^{-4} — R^{-4}$ | 0.162 | 0.419 | 0.218 | 0.281 | 0.208 | 0.351 | |
| $R^{-4} — MEP$ | 0.162 | 0.418 | 0.214 | 0.276 | 0.208 | 0.348 | |

Tablica 4.6: Test różnych metod korekty sumarycznego ładunku przenieszonego fragmentu rozkładu CAMM.

Inną potencjalną możliwość poprawy przenośności CAMM oferuje rekurencyjny charakter definicji (2.9). W miejsce m_a^{000} można użyć praktycznie dowolnej definicji ładunku, np. zastosować model ładunków atomowych o lepszej przenośności konformacyjnej i międzycząsteczkowej. Polepszenie przenośności umożliwiają modele ładunków atomowych PDC,

| Porównanie na poziomie: | Ala ₆ | | Ala ₄ Gly ₂ | | Ala ₂ Gly ₄ | | Gly ₆ |
|---|------------------|-------|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|------------------|
| | (a) | (e) | (a) | (e) | (a) | (e) | |
| I. Korekta tylko ładunku fragmentu (do zera) | | | | | | | |
| R^{-4} — MEP | 0.162 | 0.418 | 0.214 | 0.276 | 0.208 | 0.348 | 0.196 |
| II. Korekta całkowitego ładunku i momentu dipolowego | | | | | | | |
| R^{-4} — MEP | 0.187 | 0.363 | 0.207 | 0.251 | 0.212 | 0.310 | 0.182 |
| III. Korekta ładunku, momentu dipolowego i kwadrupolowego | | | | | | | |
| R^{-4} — MEP | 0.181 | 0.360 | 0.199 | 0.241 | 0.205 | 0.302 | 0.196 |
| IV. Korekta aż do momentu oktopolowego fragmentu | | | | | | | |
| R^{-1} — MEP | 0.484 | 0.380 | 0.434 | 0.371 | 0.478 | 0.380 | 0.353 |
| R^{-2} — MEP | 0.579 | 0.302 | 0.348 | 0.207 | 0.464 | 0.242 | 0.204 |
| R^{-3} — MEP | 0.223 | 0.376 | 0.209 | 0.255 | 0.224 | 0.317 | 0.184 |
| R^{-4} — MEP | 0.182 | 0.359 | 0.199 | 0.240 | 0.206 | 0.301 | 0.196 |

Tablica 4.7: Test korekty sumarycznych momentów multipolowych przenoszonych fragmentów rozkładu CAMM.

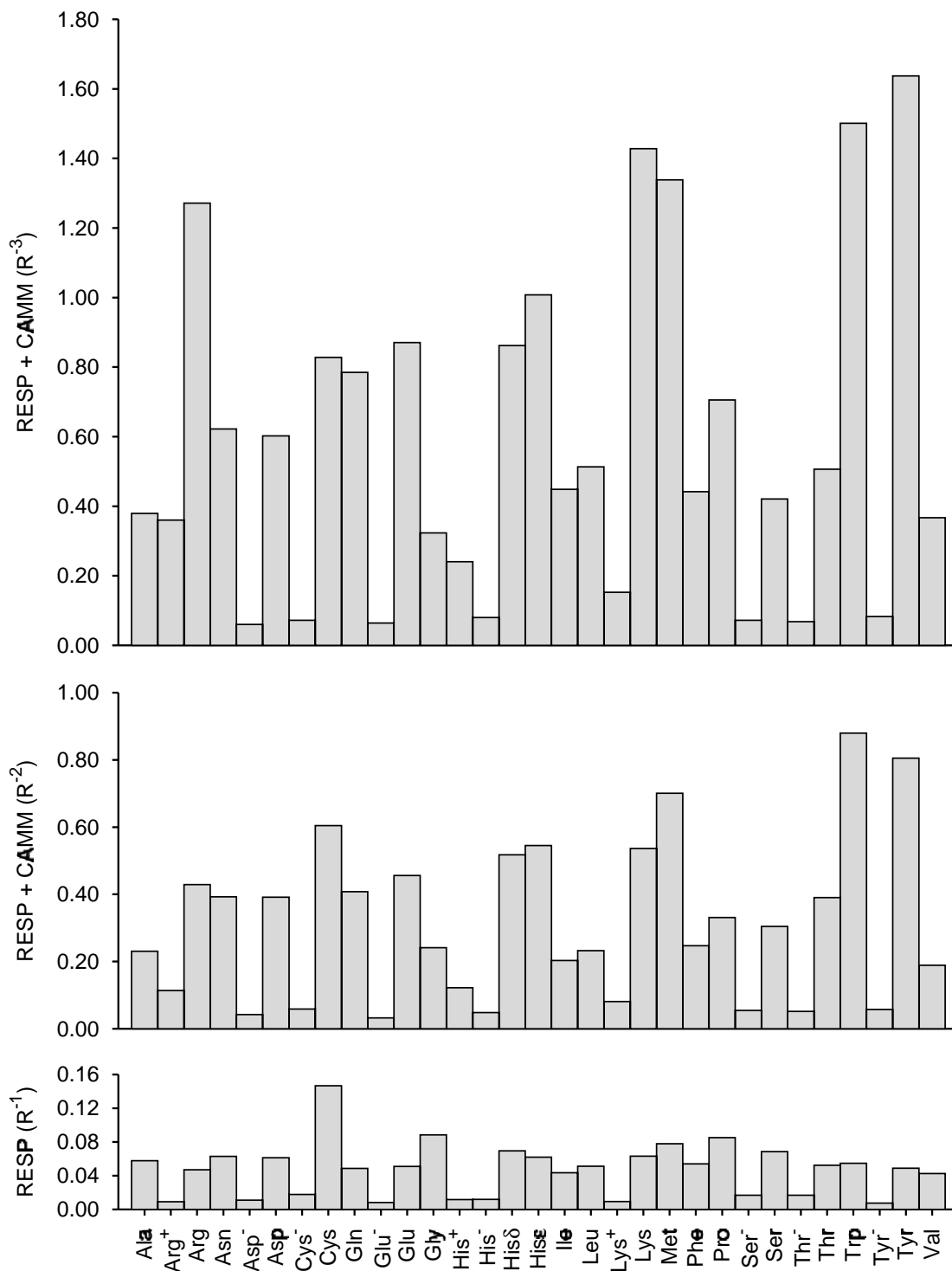
jako że proces ich optymalizacji pozwala, przez nałożenie dodatkowych więzów, wymusić odtwarzanie potencjału molekularnego wielu różnych cząsteczek lub konformerów jednocześnie. Możliwość taką daje m.in. metoda RESP [109].

Test jakości modelu CAMM opartego na przenośnych ładunkach RESP wykonano na przykładzie prezentowanej wcześniej biblioteki struktur aminokwasów. Dla zapewnienia uniwersalności biblioteki, na ładunki atomów łańcucha głównego (N, H, C_α, H_α, C, O) nałożono więzy wymuszające ich równocześnie we wszystkich aminokwasach. Wymuszono także zerowy ładunek sumaryczny przenoszonego fragmentu dla reszt neutralnych lub odpowiednią (formalną) jego wartość dla reszt naładowanych. Mimo tak ekstensywnych więzów, zaobserwowano jedynie nieznaczne pogorszenie odtwarzania MEP przez ładunki otrzymane dla poszczególnych aminokwasów (por. odpowiednie wykresy na Rys. 4.4 i 4.13). Jednak rozwinięcie CAMM (Równ. (2.9)) okazało się znacznie bardziej wrażliwe. Chociaż jakość opisu MEP przez RESP policzone bez dodatkowych więzów zyskuje na uzupełnieniu ich o wyższe momenty multipolowe CAMM, to dla ładunków policzonych z więzami prawdopodobnie kolejne momenty atomowe nie są już w stanie skompensować różnic między polem elektrostatycznym generowanym przez przenośne ładunki RESP, a opisywa-

nym macierzą gęstości elektronowej. Obserwowanym wynikiem jest rozbieżność rozwinięcia (Rys. 4.13). Poprawa tego stanu rzeczy wydaje się być możliwa — otrzymane metodą RESP z więzami ładunki atomowe, najbardziej odpowiedzialne za rozbieżność wyższych momentów CAMM, dotyczą wewnętrznych atomów, na których rozkład potencjału jest statystycznie najgorzej określony [112] (i stąd ich największa wrażliwość na więzy). Nie jest jednak jasne ani jak zrównoważyć wpływ więzów podobieństwa międzycząsteczkowego na atomy wewnętrzne i eksponowane, ani też jak kontrolować zakres zmian ładunków atomowych, aby prowadził do zbieżnego rozwinięcia CAMM.

Analizę przeprowadzoną w tym rozdziale można podsumować następująco [181]:

- Najważniejszym powodem problematycznej przenośności CAMM jest nieprzenośność ładunków. Szczególnie istotne jest odtworzenie sumarycznego ładunku przenoszonego fragmentu w docelowym otoczeniu.
- Nieprzenośność modelu CAMM nie jest jednakże ograniczona do konkretnego wyrazu rozwinięcia. Innymi słowy, zapewnienie jakości odtwarzania MEP porównywalnej z uzyskiwaną przez oryginalny rozkład CAMM wymagałoby poprawy przenośności momentów wszystkich rzędów.
- Jeśli w grę wchodzi przenoszenie fragmentów struktur między zbliżonymi otoczeniami molekularnymi, błędy nieprzenośności wydają się być zanedbywalne. Otwiera to możliwość dokładnego opisu rozkładu ładunku w kryształach oraz makrocząsteczkach symetrycznych lub o budowie periodycznej.



Rysunek 4.13: Jakość odtwarzania MEP (błędy $RRMS_V$) przez ładunki RESP policzone z użyciem więzów zapewniających przenośność międzycząsteczkową (dolny wykres); pogorszenie jakości odtwarzania MEP przez rozwinięcie CAMM zbudowane na tych ładunkach ilustruje rozbieżność szeregu CAMM.

Rozdział 5

Zastosowania uproszczonych modeli elektrostatycznych

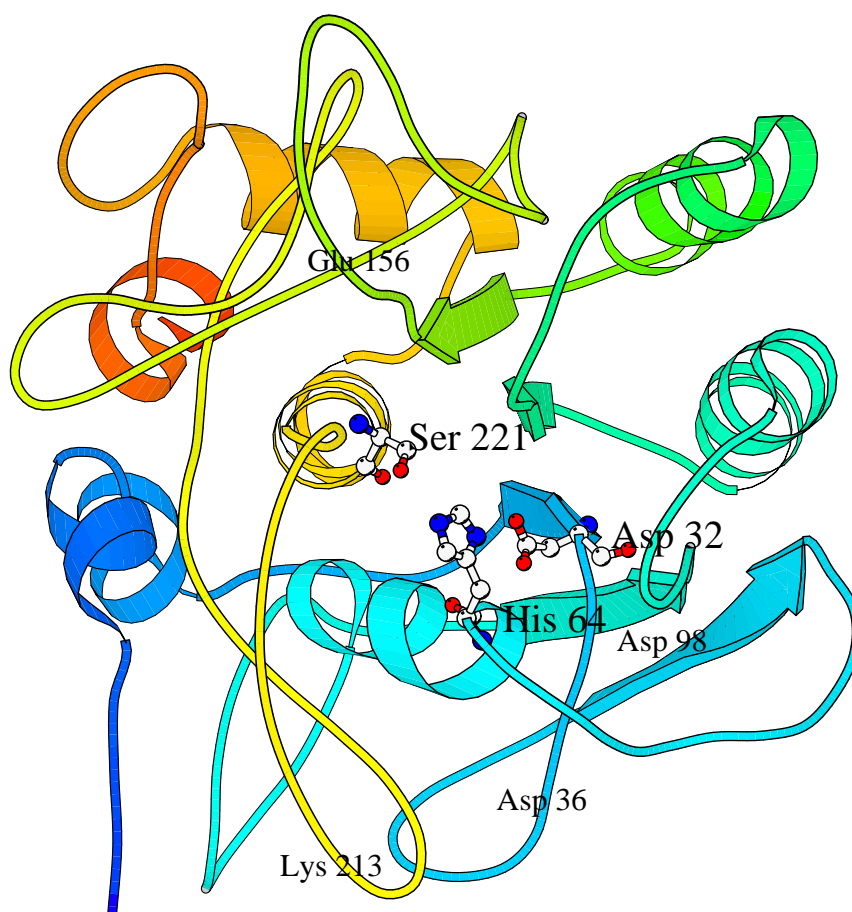
Jak opisano w rozdziale *Metody*, za pomocą różnicowych energii stabilizacji można mierzyć lub przewidywać efekty mutacji, aktywność katalityczną lub inhibicyjną. Przykłady nieempirycznych obliczeń tego rodzaju były przedstawione w rozdziale 3, natomiast w rozdziale 4 zbadane zostały możliwości i jakość różnych modeli uproszczonych, opierających się na przybliżeniu energii oddziaływań składową elektrostatyczną. Tutaj prezentowane są wyniki prób zastosowania tych modeli, z uwzględnieniem różnych stopni przybliżenia oraz dotychczas określonego zakresu ich stosowalności [185]. Część tych wyników można traktować jako rozszerzenie wcześniejszych prac [186, 187].

Dodatkowym przybliżeniem, stosowanym w poniższych obliczeniach, jest zaniedbanie wpływu medium w którym zachodzi oddziaływanie. O ile efekty oddziaływania ze środowiskiem można było pominąć przy badaniach natury oddziaływań, gdzie najistotniejsze były względne udziały różnych składowych, o tyle odniesienie wyników teoretycznych do eksperymentalnych wymaga przyjęcia innej strategii. Jednakże dokładne obliczenia energii swobodnych, zwłaszcza dla dużych układów, są wciąż bardzo kosztowne. Można by wprawdzie uzupełnić energie oddziaływań o pozostałe składowe energii swobodnej obliczone metodami przybliżonymi, ale wówczas ocena jakości modelu elektrostatycznego byłaby zupełnie nierzetelna, z powodu zsumowania potencjalnie większych błędów.

W prezentowanych poniżej badaniach przyjęto inną strategię. W przypadku obliczeń zmian pK_a w subtylizynie, skorzystano z unikalnych pomiarów efektywnych przenikalności dielektrycznych, aby wyniki eksperymentalne odnieść do rezultatów obliczeń w fazie gazowej. W pozostałych dwóch przypadkach, skupiono się na odtwarzaniu raczej trendów niż wartości bezwzględnych. Ze względu na eksperymentalnie stwierdzoną liniową zależność energii swobodnych aktywacji [188] oraz stałych inhibicji [189] od zmian oddziaływań

wywołanych mutacjami centrum aktywnego (ang. *linear free energy relationships*, LFER), podejście takie wydaje się być w pełni uzasadnione. Jako miarę jakości przybliżenia potraktowano zatem odchylenia od liniowych zależności między wartościami obliczonymi i zmierzonymi dla różnych przypadków.

5.1 Przewidywanie efektów mutacji w subtylizynie



Rysunek 5.1: Struktura subtylizyny BPN (kod PDB 1SBT). Zaznaczono reszty tworzące triadę katalityczną oraz miejsca mutacji badanych w pracy [190].

Bakteryjna proteinaza serynowa — subtylizyna (Rys. 5.1), jest jednym z niewielu enzymów, w którym znane są wartości efektywnej przenikalności dielektrycznej wewnątrz białka dla kilku różnych mutantów. Zostały one zmierzone w latach osiemdziesiątych przez zespół Fershta (Tabela 5.1). Niedawno pojawiła się praca z podobnymi wynikami dla nukleazy ze *Staphylococcus aureus* [192], ale dla mniejszego zestawu mutacji. Ponadto, wyniki Fershta dla subtylizyny wykazują większe zróżnicowanie wartości ϵ_{eff} , co zapewnia szerszy zakres porównawczy dla korelacji między wynikami obliczonymi i zmierzonymi.

| Mutacja | ϵ_{eff} | $\Delta\text{pK}_a^{\text{exp}}$ |
|--|-------------------------|----------------------------------|
| Asp36 ⁻ → Gln36 ⁰ | 90 | -0.18 |
| Asp98 ⁻ → Ser98 ⁰ | 48 | -0.40 |
| Asp98 ⁻ → Lys98 ⁺ | 55 | -0.64 |
| Lys98 ⁺ → Ser98 ⁰ | 65 | (0.25) |
| Glu156 ⁻ → Ser156 ⁰ | 45 | -0.38 |
| Glu156 ⁻ → Lys156 ⁺ | 50 | -0.63 |
| Lys156 ⁺ → Ser156 ⁰ | 59 | (0.25) |
| Asp98 ⁻ → Ser98 ⁰ oraz Glu156 ⁻ → Ser156 ⁰ | 57 | -0.63 |
| Asp98 ⁻ → Lys98 ⁺ oraz Glu156 ⁻ → Lys156 ⁺ | 66 | -1.00 |
| Lys213 ⁺ → Thr213 ⁰ | 173 | 0.08 |

Tablica 5.1: Eksperymentalnie zmierzone zmiany pK_a histydyliny 64 subtylizyny wywołane podanymi mutacjami [190]. W drugiej kolumnie podano wartości efektywnej przenikalności dielektrycznej między miejscem mutacji a His 64; Zauważalna jest znaczna polarność oraz anizotropia własności dielektrycznych otoczenia. W nawiasach podano wartości obliczone pośrednio.

Stosując równania (2.3) oraz (2.4) można przewidzieć zmiany pK_a wybranej reszty enzymu wywołane przez mutacje w jej sąsiedztwie, na podstawie oddziaływań ze zmienionym otoczeniem. Wyniki obliczone w przybliżeniu dwuciałowym (i w fazie gazowej) można odnieść do wartości eksperymentalnych zakładając stałą odpowiedź dielektryczną medium, opisaną przez efektywną przenikalność dielektryczną ϵ_{eff} . Dla katalitycznej histydyliny 64 subtylizyny, możemy zapisać:

$$\Delta\text{pK}_a^{\text{N}\rightarrow\text{M}}(\text{His64}) = \frac{\Delta_{\text{N}\rightarrow\text{M}}^{\text{DEM}}(\text{His64}^0) - \Delta_{\text{N}\rightarrow\text{M}}^{\text{DEM}}(\text{His64}^+)}{2.303 \cdot RT} = \epsilon_{\text{eff}} \cdot \Delta\text{pK}_a^{\text{exp N}\rightarrow\text{M}}(\text{His64}) \quad (5.1)$$

W zastosowanym podejściu, wartości Δ^{DEM} obliczane były jako różnice składowych elektrostatycznych energii oddziaływań o różnym stopniu przybliżenia:

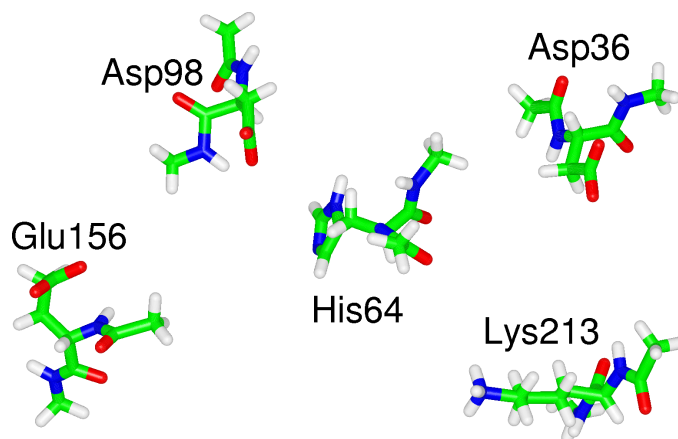
$$\begin{aligned} \Delta_{\text{N}\rightarrow\text{M}}^{\text{DEM}}(\text{His64}^0) &\approx E_{\text{EL}}^{(1)}(\text{N}, \text{His64}^0) - E_{\text{EL}}^{(1)}(\text{M}, \text{His64}^0) \\ &\approx E_{\text{EL,MTP}}^{(1)}(\text{N}, \text{His64}^0) - E_{\text{EL,MTP}}^{(1)}(\text{M}, \text{His64}^0) \\ &\approx E_{q-q}^{(1)}(\text{N}, \text{His64}^0) - E_{q-q}^{(1)}(\text{M}, \text{His64}^0) \end{aligned} \quad (5.2)$$

oraz

$$\begin{aligned}
\Delta_{N \rightarrow M}^{\text{DEM}}(\text{His64}^+) &\approx E_{\text{EL}}^{(1)}(\text{N}, \text{His64}^+) - E_{\text{EL}}^{(1)}(\text{M}, \text{His64}^+) \\
&\approx E_{\text{EL,MTP}}^{(1)}(\text{N}, \text{His64}^+) - E_{\text{EL,MTP}}^{(1)}(\text{M}, \text{His64}^+) \\
&\approx E_{q-q}^{(1)}(\text{N}, \text{His64}^+) - E_{q-q}^{(1)}(\text{M}, \text{His64}^+)
\end{aligned} \tag{5.3}$$

gdzie N i M oznaczają odpowiednio natywną lub mutowaną resztę aminokwasową w danej pozycji. We wszystkich przypadkach wartość temperatury (Równ. (5.1)) przyjęto za równą 293.23K.

Układ modelowy do obliczeń energii oddziaływań został zbudowany w następujący sposób: na współrzędne aminokwasów nr 36, 64, 98, 156 oraz 213 ze struktury krystalograficznej 1SBT z bazy PDB, łącznie z sąsiadującymi wiązaniami peptydowymi, nałożono dwuamidowe pochodne odpowiednich aminokwasów z obliczonej wcześniej biblioteki struktur i danych CAMM (rozdział 4.1.1).



Rysunek 5.2: Rozmieszczenie oraz konformacja natywnych reszt subtylizyny BPN w pozycjach 36, 64, 98, 156 i 213.

Otrzymane struktury (Rys. 5.2) użyto do nieempirycznej analizy składowych energii oddziaływań z neutralną i sprotonowaną formą histydyny 64 (Tabela 5.2), oraz dla obliczeń energii oddziaływań elektrostatycznych na różnych stopniach przybliżenia rozkładu ładunku szeregiem multipolowym CAMM (Tabela 5.3). Uzyskane różnice oddziaływań z His 64⁺ oraz His 64⁰ przeliczone zostały na wartości $\Delta\text{pK}_a(\text{His } 64)$ (w fazie gazowej), prezentowane w Tabeli 5.3.

Uzasadnieniem stosowalności w tym przypadku przybliżenia elektrostatycznego są wyniki dekompozycji energii oddziaływań histydyny 64 z każdą ze zmutowanych reszt. Wartości składowych wymiennej i deformacyjnej są dla wszystkich oddziałujących reszt zanedbywalnie małe. Wynika to ze stosunkowo dużych odległości między oddziałującymi

a) Składowe energii oddziaływań z His64⁺

| Reszta | $E_{\text{EL}}^{(1)}$ | $E_{\text{EX}}^{(1)}$ | $E_{\text{DEL}}^{(R)}$ | ΔE^{SCF} | Odległość [Å] |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|---------------|
| Asp36 ⁻ | -21.88 | 0.01 | -0.25 | -22.12 | 10.65 |
| Gln36 | 1.75 | 0.01 | -0.15 | 1.61 | 10.65 |
| Asp98 ⁻ | -30.82 | 0.00 | -0.33 | -31.15 | 10.18 |
| Lys98 ⁺ | 33.72 | 0.00 | -0.56 | 33.15 | 10.18 |
| Ser98 | -0.29 | 0.00 | -0.14 | -0.43 | 10.18 |
| Glu156 ⁻ | -25.50 | 0.00 | -0.13 | -25.63 | 18.53 |
| Lys156 ⁺ | 22.99 | 0.00 | -0.12 | 22.88 | 18.53 |
| Ser156 | -0.90 | 0.00 | -0.06 | -0.96 | 18.53 |
| Lys213 ⁺ | 21.86 | 0.00 | -0.17 | 21.69 | 12.88 |
| Thr213 | 0.91 | 0.00 | -0.02 | 0.89 | 12.88 |

b) Składowe energii oddziaływań z His64⁰ (forma δ)

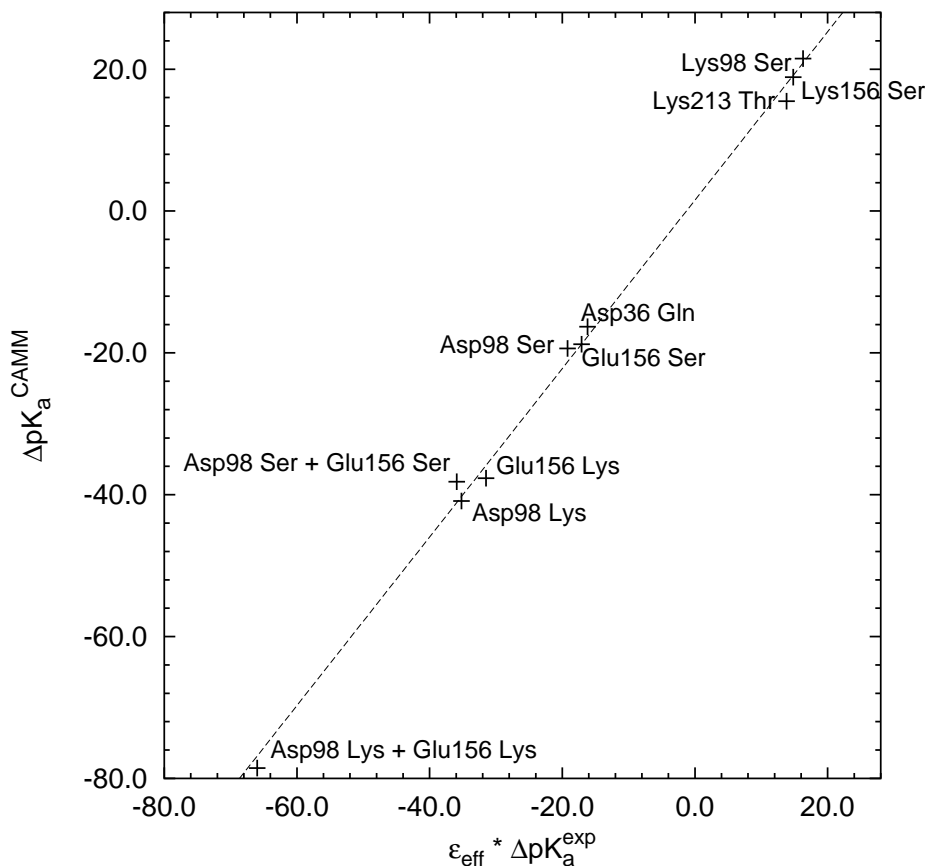
| Reszta | $E_{\text{EL}}^{(1)}$ | $E_{\text{EX}}^{(1)}$ | $E_{\text{DEL}}^{(R)}$ | ΔE^{SCF} | Odległość [Å] |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|---------------|
| Asp36 ⁻ | -1.17 | 0.01 | -0.13 | -1.29 | 10.65 |
| Gln36 | 0.22 | 0.01 | -0.03 | 0.20 | 10.65 |
| Asp98 ⁻ | -4.63 | 0.00 | -0.17 | -4.81 | 10.18 |
| Lys98 ⁺ | 6.01 | 0.00 | -0.38 | 5.63 | 10.18 |
| Ser98 | 0.23 | 0.00 | -0.01 | 0.22 | 10.18 |
| Glu156 ⁻ | 1.00 | 0.00 | -0.06 | 0.95 | 18.53 |
| Ser156 | 0.10 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 18.53 |
| Lys156 ⁺ | -0.72 | 0.00 | -0.04 | -0.75 | 18.53 |
| Ser156 | 0.10 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 18.53 |
| Lys213 ⁺ | 0.03 | 0.00 | -0.15 | -0.12 | 12.88 |
| Thr213 | -0.06 | 0.00 | -0.01 | -0.07 | 12.88 |

Tablica 5.2: Wartości składowych energii oddziaływań [kcal/mol] wybranych reszt subtylezyny z katalityczną histydyną 64. Wszystkie wartości obliczono metodą SCF z użyciem bazy 6-31G(d,p). Odległości podano między atomami węgla C_α.

cząsteczkami (najbliższe kontakty w zakresie 4–9 Å).

Z tego samego powodu, model przybliżony CAMM wykazuje praktycznie jednakową dokładność na wszystkich poziomach rozwinięcia. W tym przypadku, zupełnie wystarczające jest zatem przybliżenie oddziaływań elektrostatycznym modelem ograniczonym do ładun-

ków atomowych. Rysunek 5.3 prezentuje porównanie między zmierzonymi doświadczalnie wartościami $\epsilon_{\text{eff}} \cdot \Delta\text{pK}_a$, a ΔpK_a histydyny 64 obliczonymi w fazie gazowej. Odchylenia od liniowej korelacji są tutaj zdominowane błędami doświadczalnymi, które dla pomiarów przenikalności dielektrycznej ϵ_{eff} wynosiły ok. 10–20% [190, 191].



Rysunek 5.3: Korelacja między obliczonymi a zmierzonymi wartościami zmian pK_a katalizycznej histydyny 64, wywołanych mutacjami w jej otoczeniu. Ze względu na praktycznie całkowite nakładanie się punktów dla różnych poziomów rozwinięcia CAMM, zaprezentowano tylko wartości obliczone dla rozwinięcia CAMM(R^{-4}).

5.2 Przewidywanie aktywności inhibitorów leucyloaminopeptydazy

Oprócz podstawowych badań nad katalizą enzymatyczną oraz projektowaniem nowych biokatalizatorów dla potrzeb przemysłu, przedmiotem równie dużego zainteresowania, szczególnie komercyjnego, jest metodologia rozwijana w kierunku racjonalnego projektowania inhibitorów, która obecnie stanowi podstawę badań nad nowymi substancjami biologicz-

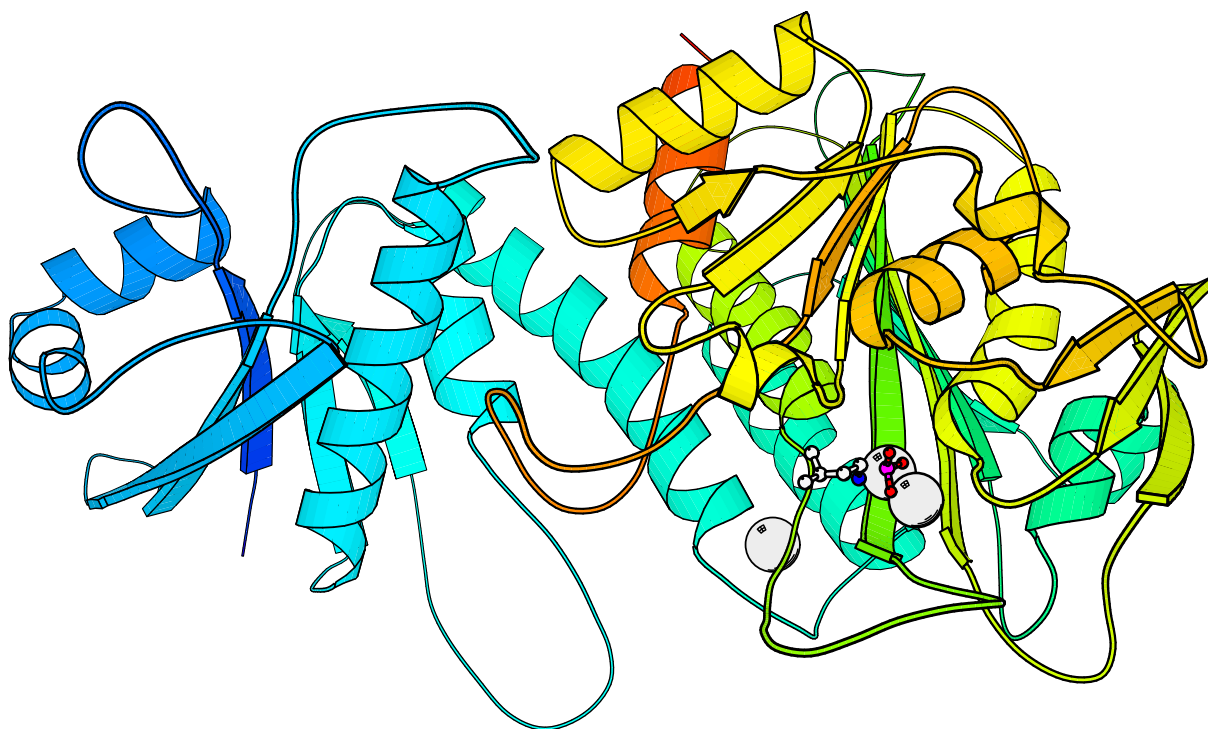
| Mutacja | ΔpK_a^{q-q} | $\Delta pK_a^{\text{CAMM}(R^{-4})}$ | ΔpK_a^{EL} | $\epsilon_{\text{eff}} \cdot \Delta pK_a^{\text{exp}}$ |
|--|---------------------|-------------------------------------|---------------------------|--|
| Asp36 ⁻ → Gln36 ⁰ | -16.44 | -16.32 | -16.57 | -16.2 |
| Asp98 ⁻ → Ser98 ⁰ | -19.34 | -19.38 | -19.13 | -19.2 |
| Asp98 ⁻ → Lys98 ⁺ | -40.80 | -40.88 | -40.17 | -35.2 |
| Lys98 ⁺ → Ser98 ⁰ | 21.46 | 21.50 | 21.04 | (16.3) |
| Glu156 ⁻ → Ser156 ⁰ | -18.87 | -18.79 | -19.00 | -17.1 |
| Glu156 ⁻ → Lys156 ⁺ | -36.95 | -37.67 | -37.42 | -31.5 |
| Lys156 ⁺ → Ser156 ⁰ | 18.08 | 18.88 | 18.42 | (14.8) |
| Asp98 ⁻ → Ser98 ⁰ oraz | | | | |
| Glu156 ⁻ → Ser156 ⁰ | -38.21 | -38.16 | -38.13 | -35.9 |
| Asp98 ⁻ → Lys98 ⁺ oraz | | | | |
| Glu156 ⁻ → Lys156 ⁺ | -77.75 | -78.55 | -77.59 | -66.0 |
| Lys213 ⁺ → Thr213 ⁰ | 15.39 | 15.49 | 15.55 | 13.8 |

Tablica 5.3: Wartości zmian pK_a histydyny 64 w fazie gazowej, obliczone z użyciem hierarchii przybliżeń oddziaływań elektrostatycznych od modelu opartego na ładunkach Mullikena (ΔpK_a^{q-q}), przez energię oddziaływań $E_{\text{EL},\text{MTP}}^{(1)}$ z uwzględnieniem oddziaływań ładunek-oktupol ($\Delta pK_a^{\text{CAMM}(R^{-4})}$), aż do oddziaływań przybliżonych składową elektrostatyczną $E_{\text{EL}}^{(1)}$. Wartości otrzymane metodą CAMM na poziomie rozwinięcia $\text{CAMM}(R^{-2})$ i $\text{CAMM}(R^{-3})$ pominięto ze względu na zaniedbywalne różnice.

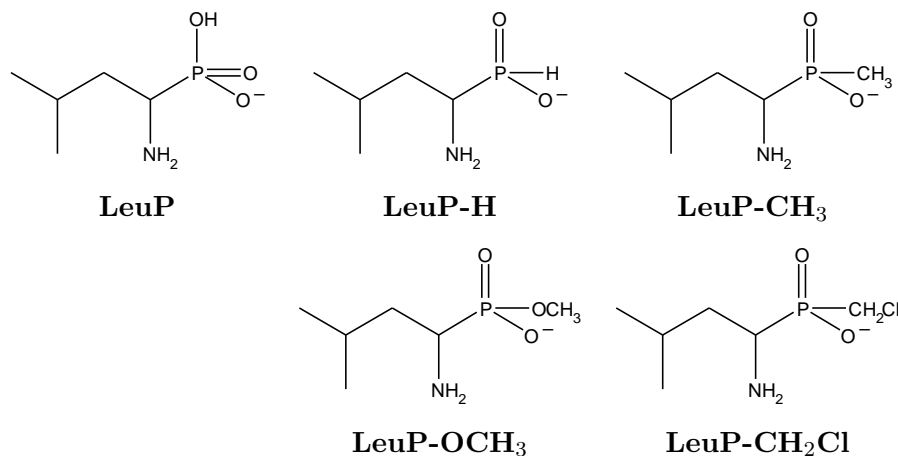
nie czynnymi: lekami, pestycydami, herbicydami itp. Kluczem do takiej metodologii jest szczegółowe zrozumienie oddziaływań między ligandem a receptorem; jednocześnie, wykorzystanie uproszczonego modelu oddziaływań jest niezbędne dla efektywnej oceny zdolności wiązania tysięcy możliwych struktur, generowanych automatycznie [193].

W celu porównania modeli uproszczonych proponowanych w tej pracy, oraz ilustracji ich użyteczności w badaniach tego typu, wybrano enzym aminopeptydazę leucylową (ang. *leucine aminopeptidase*, LAP), E.C. 3.4.11.1 (Rys. 5.4), [194]. Jest to egzo-peptydaza katalizująca hydrolizę N'-końcowego wiązania peptydowego [195], pełniąca ważną rolę w metabolizmie aktywnych biologicznie peptydów oraz modyfikacji i degradacji białek cytozolowych [196, 197]. Zmiana aktywności tego enzymu jest związana z różnymi stanami chorobowymi, m.in. rakiem oraz kataraktą soczewki oka [198]. Dla celów niniejszej pracy, istotna jest dostępność dokładnej struktury krystalograficznej białka związanego z inhibitorem (fosfonowym analogiem L-leucyny) [195], oraz eksperymentalnych stałych inhibicji dla tego analogu i jego pochodnych [199, 200] (Rys. 5.5).

Możliwości uproszczenia modelu oddziaływań dla tego przypadku poszukiwano w dwóch



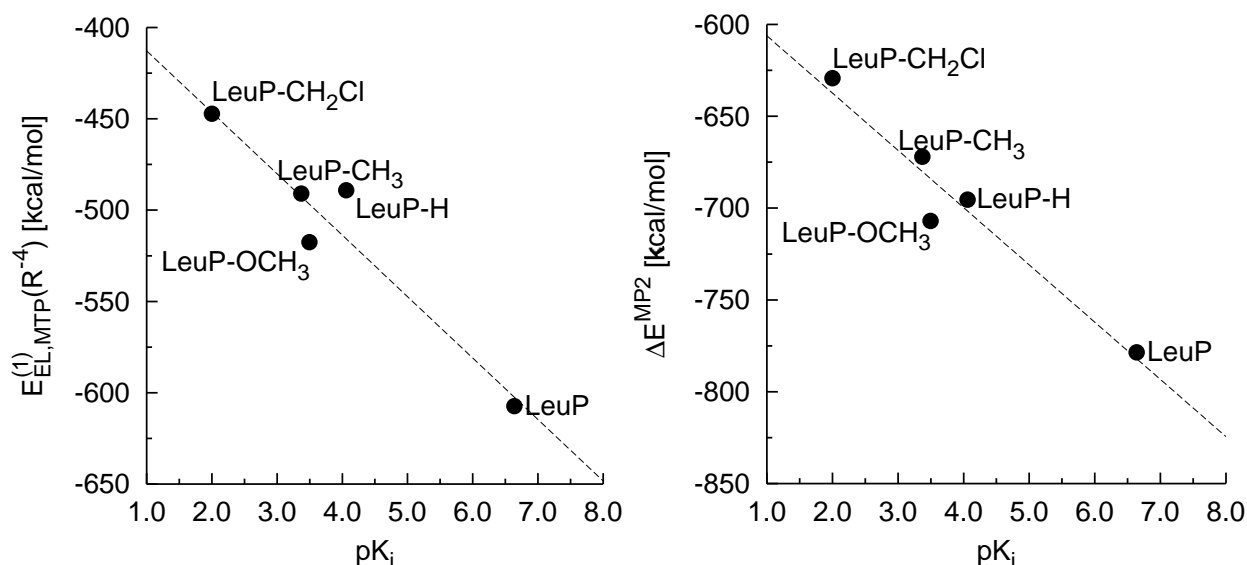
Rysunek 5.4: Struktura przestrzenna aminopeptydazy leucylowej z soczewki oka wołu (kod PDB 1LCP). Strukturę inhibitora — fosfonowego analogu leucyny (LeuP) przedstawia model kulkowy; duże kule przedstawiają atomy cynku.



Rysunek 5.5: Struktury inhibitorów aminopeptydazy leucylowej — pochodnych fosfonowego analogu leucyny (LeuP).

kierunkach [194]. W pierwszym podejściu, policzono wartości nieempirycznych energii oddziaływań każdego z inhibitorów z okrojonym modelem centrum aktywnego (Rys. 5.7), uzyskując dobrą korelację między wartościami teoretycznymi i doświadczalnymi, zarówno na poziomie metody pola samouzgodnionego jak i z uwzględnieniem korelacji metodą

MP2 [201]. Analiza oddziaływań dwuciałowych pozwoliła dalej uprościć model centrum aktywnego do atomu Zn488 oraz anionu NH_4^+ reprezentującego resztę Lys262 [185], z zachowaniem korelacji między wartościami energii oddziaływań ΔE a pK_i [201].



Rysunek 5.6: Korelacja między aktywnością inhibicji aminopeptydazy leucylowej przez pochodne fosfoleucyny a energią oddziaływania z centrum aktywnym na poziomie MP2 oraz w przybliżeniu elektrostatycznym CAMM [194, 201].

Z drugiej strony, dekompozycja energii oddziaływań wykazała, że mimo stosunkowo bliskich kontaktów, oddziaływania elektrostatyczne są w tym przypadku dominujące i odpowiedzialne za specyficzność wiązania różnych inhibitorów, zarówno w pełnym, jak i uwzględniającym tylko dwie reszty modelu centrum aktywnego (Rys. 5.7) [201]. Podobne wyniki otrzymano dla innej rodziny inhibitorów, będących pochodnymi fosfonowego analogu feniloalaniny [60, 136]. Możliwe było zatem zbadanie dalszych przybliżeń, stosownie do hierarchii jakości i kosztów przedstawionej równaniem (1.18).

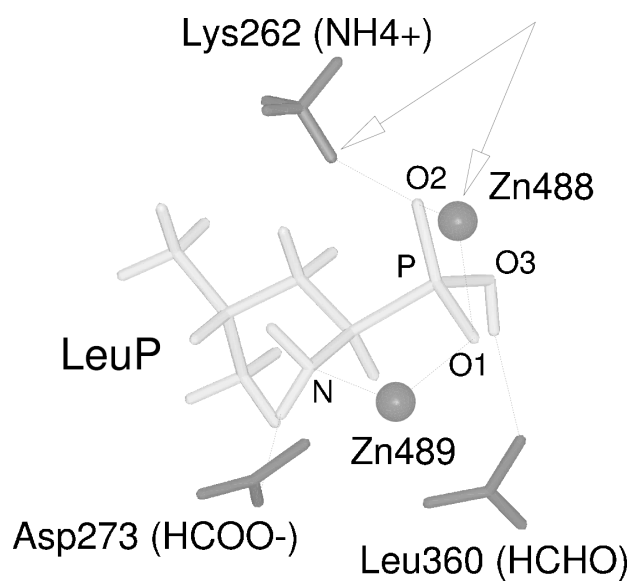
Wyniki obliczeń współczynników korelacji między modelem teoretycznym a wynikami doświadczalnymi zebrane są w tabeli 5.4, a odpowiednie wykresy na rysunku 5.6. Widoczna jest wysoka i niemal jednakowa jakość zbadanych przybliżeń. Zauważalny i znaczny spadek jakości modelu następuje praktycznie tylko w przypadku użycia ładunków atomowych Mullikena, nawet jeśli są uzupełnione o atomowe momenty dipolowe. Uwzględnienie w rozwinięciu CAMM atomowych momentów kwadrupolowych, równoznaczne z wykorzystaniem modeli ładunków dopasowywanych do potencjału (por. rozdział 4.1.3), pozwala osiągnąć korelację identyczną jak przy pełnym opisie oddziaływań elektrostatycznych.

Zaprezentowany przykład potwierdza proponowaną w literaturze przedmiotu koncepcję wiązania ligandów jako „elektrostatycznego zamka i klucza” [72, 73, 136]. Co jest jednak

| Metoda | Zn488 | Lys262 | Zn488, Zn489, Lys262, Asp273, Leu360 |
|---------------------------------|-------|--------|--------------------------------------|
| ΔE^{MP2} | 0.95 | 0.95 | 0.97 |
| ΔE^{SCF} | 0.92 | 0.95 | 0.95 |
| $E^{(1)}$ | 0.91 | 0.93 | 0.94 |
| $E_{\text{EL}}^{(1)}$ | 0.91 | 0.86 | 0.93 |
| $E_{\text{Camm}}^{(1)}(R^{-4})$ | 0.90 | 0.92 | 0.96 |
| $E_{q-q}^{(1)}$ | 0.75 | 0.81 | 0.82 |

Tablica 5.4: Porównanie teoretycznych oszacowań energii wiązania z eksperymentalnymi wartościami pK_i dla inhibitorów z rysunku 5.5 na podstawie współczynników korelacji [194, 201].

istotniejsze, pokazuje on, w jaki sposób szczegółowa analiza natury oddziaływań pozwala w racjonalny sposób zbudować najlepszy model przybliżony, na miarę potrzeb i możliwości obliczeniowych.

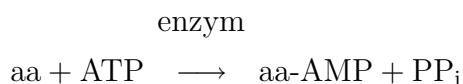


Rysunek 5.7: Model centrum aktywnego aminopeptydazy leucylowej z zadokowanym fosfonowym analogiem leucyny. Strzałkami oznaczono punkty oddziaływań wystarczające dla opisu specyficzności wiązania inhibitorów [194].

5.3 Przewidywanie aktywności katalitycznej reszt aminokwasowych w syntetazach aminoacylo-tRNA

Syntetazy aminoacylo-tRNA (aa-tRNA) tworzą pod wieloma względami unikalną grupę enzymów. Niezwykle ważne dla biochemicznych podstaw życia, jako odpowiedzialne za prawidłową translację kodu genetycznego na sekwencję białek, należą do najstarszych enzymów na Ziemi. Wszystkie przeprowadzają tę samą reakcję chemiczną, różniąc się specyficznością substratową. Jednocześnie wiele charakterystycznych cech strukturalnych pozwala podzielić je na dwie odrębne grupy, znane jako klasy I i II, pochodzące niewątpliwie od ewolucyjnie różnych przodków. Również w obrębie każdej z klas, enzymy pochodzące z różnych organizmów lub specyficzne dla różnych aminokwasów wykazują bardzo różny stopień podobieństwa. Cechy te są źródłem niegasnącego zainteresowania tą grupą enzymów [202, 203].

Ponieważ reakcje katalizowane przez syntetazy aa-tRNA, w szczególności etap aktywacji (adenylacji) aminokwasu są takie same dla wszystkich aminokwasów, jest bardzo prawdopodobne, że we wszystkich przypadkach mechanizm reakcji jest także ten sam:



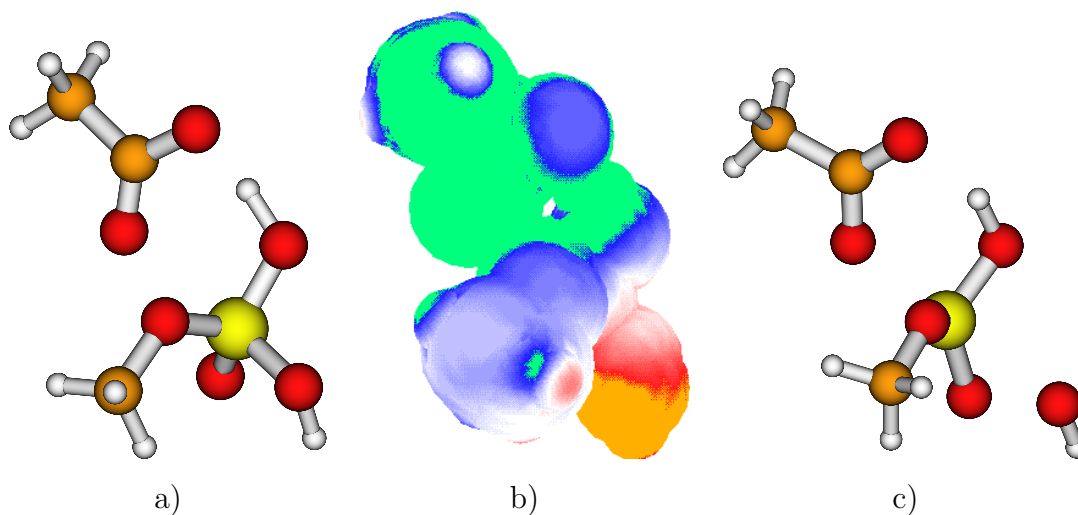
co oznaczałoby, że różne enzymy, a nawet poszczególne reszty, można porównać przez ich zdolność do różnicowej stabilizacji tego samego (modelowego) stanu przejściowego [137]. Pomysł ten wykorzystano do identyfikacji ważnych katalitycznych reszt syntetazy tyrozylo-tRNA [187].

W tym czasie zakres badań musiał być ograniczony, ze względu na niedostępność struktur krystalograficznych dla innych enzymów. Ówczesne wyniki miały stosunkowo przybliżony charakter, jako że konformacja łańcuchów bocznych aminokwasów opisujących odpowiednie rozkłady ładunku CAMM nie była dopasowywana do współrzędnych krystalograficznych, lecz nakładano tylko pozycje atomów C_α , N i C sztywnych, zoptymalizowanych w fazie gazowej reszt. Ponieważ wyniki przewidywań aktywności katalitycznej reszt centrum aktywnego okazały się już wtedy obiecujące, badania te zostały obecnie rozszerzone [60, 204]. Było to możliwe ze względu na pojawienie się wielu nowych struktur enzymów z tej rodziny.

Dla porównań między syntetazami o różnej specyficzności substratowej, modelowy stan przejściowy reakcji adenylacji powinien być na tyle okrojony, aby nie wyróżniać żadnego enzymu. Ponadto, z uwagi na jakościowy charakter takich badań porównawczych — ma-

jący na celu porównanie i identyfikację reszt istotnych dla katalizy — obliczeń modelowej ścieżki reakcji dokonano wykorzystując metodę pola samouzgodnionego i stosunkowo niezbyt wymagającą bazę 3-21G [187]. Uzyskane struktury kompleksu substratów oraz stanu przejściowego zilustrowano na rysunku 5.8. Rysunek 5.8b schematycznie pokazuje potencjał elektrostatyczny, będący różnicą potencjałów generowanych przez stan przejściowy i kompleks substratów na powierzchni substratów. Zgodnie z koncepcją elektrostatycznej komplementarności, największą aktywność katalityczną powinny wykazywać te reszty otoczenia, które najbardziej stabilizują taki rozkład ładunku (minimalizując Δ^{DTSS}).

Dla sprawdzenia tej hipotezy, struktury substratów i stanu przejściowego zadokowano w centrach aktywnych wybranych syntetaz aa-tRNA i wybrano reszty leżące w najbliższej okolicy (do 10Å). Wykorzystując bibliotekę CAMM dla aminokwasów, opisaną w rozdziale 4, obliczono wartości Δ^{DTSS} (w przybliżeniu opartym na $E_{\text{CAMM}}^{(1)}(R^{-4})$) dla wszystkich możliwych mutacji w każdej z tych pozycji. Dla tego typu jakościowych porównań, ograniczona przenośność konformacyjna CAMM nie ma dużego znaczenia, można było za-



Rysunek 5.8: Różnicowy potencjał elektrostatyczny generowany przez nałożone struktury stanu przejściowego i kompleksu substratów modelu reakcji katalizowanej przez syntetazy aa-tRNA.

a) struktura kompleksu substratów (SC)

b) różnicowy potencjał ($V_{\text{TS}} - V_{\text{SC}}$) na powierzchni van der Waalsa kompleksu substratów. Kolorami zielonym, niebieskim, błękitnym, białym, różowym, czerwonym i żółtym oznaczono przedziały wartości odpowiednio ≤ -60 , $-60 - -40$, $-40 - -10$, $-10 - 10$, $10 - 40$, $40 - 60$ i ≥ 60 kcal/mol.

c) struktura stanu przejściowego (TS).

| reszta natywna | Teoretyczna aktywność katalityczna Najwyższa → Najniższa | Δ^{DTSS} [kcal/mol] | Odl. [Å] |
|---|---|--------------------------------------|-------------|
| Syntetaza His-tRNA (<i>E. coli</i>) | | | |
| R+ 113 | R+D-E-Q W C N A T P I V G L F Y S M H H+K+ | -4.8 | 4.9 |
| R+ 121 | H+K+R+H N S I P V W L G M F Y A Q C T E-D- | -7.0 | 4.5 |
| E- 131 | D-E-Q T C A Y F M G I P V L S N W H R+K+H+ | -2.1 | 8.1 |
| R+ 311 | K+H+R+H N T P L S V I M G C A F W Y Q D-E- | -9.9 | 3.8 |
| Syntetaza Ser-tRNA (<i>T. thermophilus</i>) | | | |
| R+ 256 | K+R+D-W C T N A I M P Q L V G F Y S H E-H | -4.9 | 1.3 |
| R+ 271 | H+K+R+H N S I G V P L M F Y A Q T C W E-D- | -5.3 | 5.8 |
| E- 279 | E-D-Q M Y C F G A V I L T S P N H W R+H+K+ | -4.3 | 5.2 |
| R+ 386 | K+H+R+N H T P L V I S A C G F M Y W Q D-E- | -13.0 | 3.2 |
| Syntetaza Lys-tRNA (<i>E. coli</i>) | | | |
| R+ 262 | R+D-Q E-W C N A T I P G V M L F Y S H K+H | -5.7 | 4.3 |
| H+ 270 | H+K+W R+H N S P I V G L M F Y A T Q C E-D- | -6.2 | 4.8 |
| E- 278 | E-D-Q C Y F A G M T I V L S W P N H R+H+K+ | -2.0 | 8.4 |
| R+ 480 | K+H+H R+N L S V P T I G M A F C Y W Q D-E- | -7.0 | 3.3 |
| Syntetaza Asp-tRNA (<i>S. cerevisiae</i>) | | | |
| R+ 325 | R+K+D-Q W C N I T A P M G V F L S E-Y H H+ | -6.3 | 3.7 |
| H+ 334 | H+K+W R+H N S L P V I M G C F Y Q A T E-D- | -13.9 | 2.0 |
| D- 342 | E-D-Q C W Y G M F A I V L S T P N H R+H+K+ | -1.6 | 8.7 |
| R+ 531 | K+H+H R+N S L V P M T G I F Y A C W Q D-E- | -4.6 | 3.1 |

Tablica 5.5: Różnicowa stabilizacja stanu przejściowego przez odpowiadające sobie reszty katalityczne wybranych syntetaz aa-tRNA klasy II, oraz teoretyczne przewidywania efektów mutacji, uszeregowane w kierunku malejących energii stabilizacji stanu przejściowego. Wartości Δ^{DTSS} obliczono w przybliżeniu CAMM(R^{-4}). Dla oszczędności miejsca użyto jednoliterowych kodów aminokwasów [138] z oznaczeniem stanu protonacji.

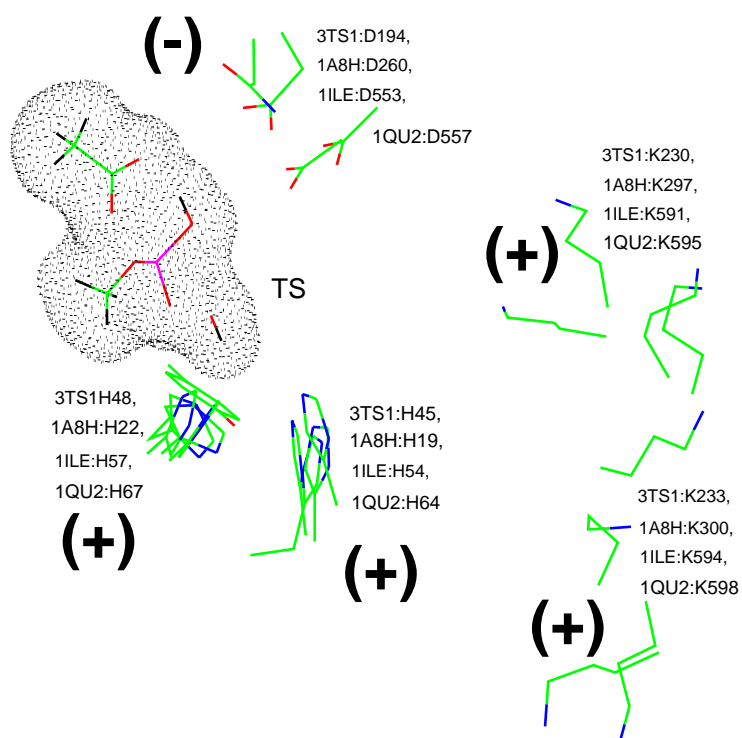
tem dopasować konformację mutowanych reszt tak, aby jak najlepiej pokrywała się z oryginalnym łańcuchem bocznym. Możliwe mutacje uporządkowano wg rosnących wartości Δ^{DTSS} . Wyniki dla najważniejszych katalitycznie reszt kilku syntetaz aa-tRNA klasy II zebrane są w tabeli 5.5. Dokładność przewidywań teoretycznych jest w tym przypadku wyższa niż we wcześniejszych badaniach [187], wykorzystujących prostszy model.

Wyniki tego typu można wykorzystać dwojako. Użyteczna jest możliwość *a priori* przewidywania najlepszych mutacji (lub wykluczenia zbyt niekorzystnych) przy wykorzystaniu modelu o niewielkim koszcie obliczeniowym — na przykład, przy projektowaniu optymal-

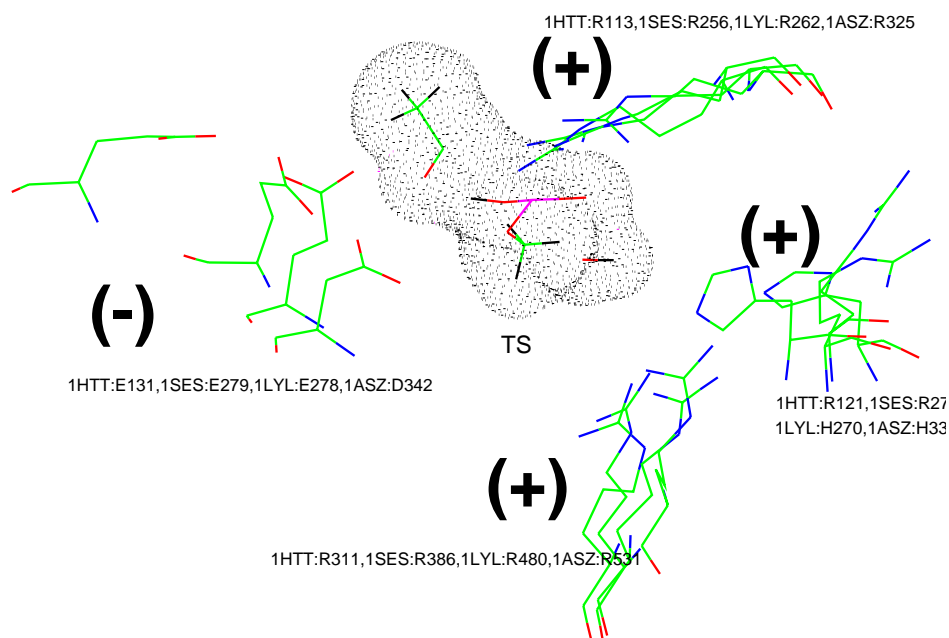
| Klasa I | | Klasa II | |
|-------------|-----|-------------|-----|
| 3TS1 | 37 | 1SES | 250 |
| 1A8H | 11 | 1HTT | 108 |
| 1ILE | 46 | 1LYL | 257 |
| 1QU2 | 56 | 1ASZ | 320 |
| 3TS1 | 184 | 1SES | 268 |
| 1A8H | 250 | 1HTT | 120 |
| 1ILE | 543 | 1LYL | 267 |
| 1QU2 | 547 | 1ASZ | 430 |
| 3TS1 | 220 | 1SES | 378 |
| 1A8H | 289 | 1HTT | 303 |
| 1ILE | 583 | 1LYL | 472 |
| 1QU2 | 587 | 1ASZ | 523 |

Rysunek 5.9: Porównanie 4 fragmentów sekwencji syntetaz aa-tRNA klas I i II, z zaznaczeniem konserwatywnych, ważnych katalitycznie aminokwasów. Pochodzenie enzymów oznaczono odpowiednimi kodami z Protein Data Bank: 3TS1 – syntetaza tyrozylo-tRNA z *B. stearothermophilus*; 1A8H – s. Met-tRNA (*T. thermophilus*); 1ILE – s. Ile-tRNA (*T. thermophilus*); 1QU2 – Ile-tRNA (*E. coli*); 1SES – s. Ser-tRNA (*T. thermophilus*); 1HTT – s. His-tRNA (*E. coli*); 1LYL – s. Lys-tRNA (*E. coli*); 1ASZ – s. Asp-tRNA (*S. cerevisiae*).

nych biokatalizatorów do użytku przemysłowego. Z drugiej strony, prezentowana metoda jest wartościowym narzędziem badawczym, pozwalającym uzupełnić wnioski płynące np. z porównawczej analizy sekwencji enzymów różnego pochodzenia (Rys. 5.9). Często bowiem konserwatywne reszty różnych sekwencji nie są bezpośrednio związane z katalizą — w opisywanym przypadku, mogą być np. odpowiedzialne za wiązanie cząsteczki tRNA. Identyfikacja reszt katalitycznych na podstawie analizy sekwencji i tzw. intuicji chemicznej może czasami prowadzić do błędnych wniosków. Opisywana metoda nie tylko potwierdza rolę katalityczną tych samych reszt, które są konserwatywne między podobnymi enzymami, ale także pozwala sprawdzić, które z konserwatywnych aminokwasów są rzeczywiście zaangażowane w katalizę oraz pośrednio zweryfikować sugerowany mechanizm reakcji. Dla ilustracji, na rysunkach 5.10 i 5.11 przedstawiono nałożone struktury ważnych katalitycznie aminokwasów odpowiednio dla syntetaz klas I i II. Dodatkowo, porównanie z rysunkiem 5.8 pozwala jakościowo porównać elektrostatyczną komplementarność centrum aktywnego i stanu przejściowego, mimo że rozmieszczenie reszt katalitycznych jest inne dla każdej z klas.



Rysunek 5.10: Nałożenie aktywnych katalitycznie reszt 4 syntetaz aa-tRNA klasy I. Każda reszta opisana jest kodem PDB enzymu, jednoliterowym kodem aminokwasu oraz jego numerem w sekwencji.



Rysunek 5.11: Nałożenie aktywnych katalitycznie reszt 4 syntetaz aa-tRNA klasy II (por. Rys. 5.10).

Rozdział 6

Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzono nieempiryczną analizę oddziaływań w centrach aktywnych szeregu enzymów i określono fizyczną naturę wynikających z nich własności, takich jak katalityczna aktywność reszt wchodzących w skład centrum aktywnego rybonukleazy A i mutazy choryzmianowej (Rozdz. 3), zmiany pK_a reszty katalitycznej subtylizyny wywołane substytucją aminokwasów (Rozdz. 5.1), oraz specyficzność wiązania inhibitorów aminopeptydazy leucylowej (Rozdz. 5.2). Prezentowane wyniki pozwalają lepiej zrozumieć fizyczne źródła aktywności katalitycznej i inhibicyjnej enzymów, i stwarzają podstawy do racjonalnej konstrukcji lub optymalnego doboru przybliżonych modeli teoretycznych stosowanych w opisie własności białek. W niektórych przypadkach, uzyskane wyniki porównano z dostępnymi danymi doświadczalnymi (Rozdz. 5.1, 5.2), lub — jak w przypadku przewidywania optymalnych mutacji — z ewolucyjną konserwatywnością reszt zidentyfikowanych jako istotne dla katalizy (Rozdz. 5.3), uzyskując we wszystkich przypadkach bardzo dobrą korelację. Wartość przeprowadzonych badań powiększa fakt, że opublikowane dotychczas wyniki supermolekularnych obliczeń nieempirycznych dla enzymów bardzo rzadko oferują podobny wgląd w naturę efektów katalitycznych i inhibicji.

Z uwagi na stwierdzoną istotną rolę efektów elektrostatycznych kolejnym tematem, któremu poświęcono wiele uwagi, były badania zmierzające w kierunku konstrukcji w miarę uniwersalnego modelu rozkładu ładunku uwzględniającego anizotropię gęstości elektronewej atomów, który mógłby znaleźć zastosowanie w badaniach oddziaływań w układach białkowych (Rozdz. 4). Po raz pierwszy przedstawiono kompletną bibliotekę skorelowanych atomowych momentów multipolowych CAMM dla aminokwasów, uwzględniającą wszystkie formy protonacji grup polarnych [181]. Porównano jakość rozwinięcia CAMM oraz alternatywnych modeli rozkładu ładunku dla aminokwasów, porównując uzyskany przy ich użyciu opis molekularnego potencjału elektrostatycznego z dokładnymi wartościami spodziewanymi. Pokazano możliwość oszacowania efektów elektrostatycznych z dowolnie

założoną dokładnością (rozdziały 4.1.1–4.1.3).

Podjęto próbę zidentyfikowania problemów związanych z konstrukcją ulepszonych pól siłowych (FF), umożliwiających dokładniejszy niż dotychczas opis rozkładu ładunku w makrocząsteczkach przez łączenie fragmentów przeniesionych z innych cząsteczek i konformacji. Pokazano, że możliwe jest zbudowanie uniwersalnego i anizotropowego modelu opisu molekularnego rozkładu ładunku w oparciu o atomowe momenty multipolowe CAMM, który okazał się mniej wrażliwy na zmiany konformacji [181] niż dotychczas badany model DMA [179] (Rozdz. 4.1.4). Wykazano również znakomitą przenośność międzycząsteczkową atomowych momentów multipolowych CAMM między symetrycznymi otoczeniami o dużym podobieństwie (Rozdz. 4.2), co otworzyło drogę dla dokładniejszego opisu oddziaływań elektrostatycznych oraz katalizy w układach symetrycznych, takich jak zeolity [184]. Może być także możliwe polepszenie opisu układów periodycznych, np. DNA.

Szczegółowa analiza źródeł nieprzenośności atomowych momentów multipolowych między różnymi otoczeniami molekularnymi (Rozdz. 4.2) pozwoliła po raz pierwszy zidentyfikować podstawowe źródło błędów, jakim okazał się znaczny przepływ ładunku między atomami. Prowadzi on — ze względu na arbitralny podział rozkładu ładunku między atomy — do niefizycznych ładunków całkowitych przenoszonych fragmentów [181]. Wniosek ten wydaje się być (pośrednio) potwierdzany przez najnowsze badania metodami opartymi na zasadzie równoważenia potencjału chemicznego (ang. *chemical potential equalization*, CPE) [205]. Przedstawiona analiza pozwala na wyznaczenie kierunku dalszych badań, sugerując metodę polepszenia przenośności międzycząsteczkowej CAMM przez umożliwienie relaksacji ładunków atomowych, np. wspomnianą metodą CPE [117].

Zastosowana metoda podziału energii oddziaływań na składowe $E_{\text{EL}}^{(1)}$, $E_{\text{EX}}^{(1)}$, $E_{\text{DEL}}^{(R)}$ oraz $E_{\text{CORR}}^{(R)}$ [60] pozwoliła dla wybranych przypadków zweryfikować powszechne założenie o dominacji w katalizie i inhibicji oddziaływań elektrostatycznych (Rozdz. 3). W obydwu badanych przypadkach, mimo względnie dużych różnic w charakterze centrów aktywnych rybonukleazy A i mutazy choryzmianowej, zaobserwowano dobrą zbieżność wartości ΔE^{SCF} i $E_{\text{EL}}^{(1)}$ oraz wartości różnicowych Δ^{DTSS} i $\Delta E_{\text{EL}}^{(1)}$ dla odległości międzyatomowych przekraczających ok. 2.7 Å. Wyniki te potwierdzają zasadność stosowania przybliżenia elektrostatycznego dla większych odległości kontaktowych [135, 185] i mogą służyć jako podstawa określenia granic między podukładami modelowanymi różnymi metodami w obliczeniach QM/MM. Pokazano także, że przewidywań np. ról katalitycznych reszt centrum aktywnego, opartych na wynikach przybliżonych w zakresie ich stosowalności, nie da się w ogólnym przypadku ekstrapolować do małych odległości międzycząsteczkowych (Rozdz. 3.1).

Wykonano pierwszą nieempiryczną analizę fizycznej natury zmian pK_a w centrum aktywnym dla różnych mutantów subtylizyny, wskazując na absolutnie dominującą rolę od-

działań elektrostatycznych (Rozdz. 5.1).

W oparciu o wnioski z badań przedstawionych w rozdziale 3, zastosowano metodę przewidywania katalitycznej aktywności reszt centrum aktywnego na podstawie elektrostatycznej stabilizacji stanu przejściowego [137,187]. W rozdziale 5.3) pokazano, że uszeregowanie reszt centrum aktywnego względem odpowiednich wartości Δ^{DTSS} pozwala zidentyfikować aminokwasy istotne dla katalizy i jest uzupełnieniem przewidywań opartych na ich ewolucyjnej konserwatywności [60]. Korzystając z tej metody, zidentyfikowano odpowiadające sobie aminokwasy w centrach aktywnych różnych enzymów należących do tej samej klasy aminokwasowych syntetaz aminoacylo-tRNA.

Wykonanie szczegółowej, nieempirycznej analizy natury oddziaływań między centrum aktywnym a szeregiem inhibitorów aminopeptydazy leucylowej (Rozdz. 5.2) w kontekście zaproponowanej w tej pracy hierarchii modeli obliczeniowych (Równ. (1.18)) pozwoliło, drogą eliminacji mniej istotnych składowych, uzyskać bardzo prosty model odtwarzający względną specyficzność wiązania z centrum aktywnym [194,201]. Zaproponowane postępowanie pozwala w systematyczny sposób określić optymalny poziom opisu teoretycznego badanych zjawisk, i jest godne polecenia wtedy, gdy wymagane jest przeprowadzenie wielu obliczeń dla zbliżonych układów.

Literatura

- [1] Wladkowski, B.D.; Krauss, M.; Stevens, W.J. *J. Am. Chem. Soc.* **117(42)**, 1995, 10537–10545
- [2] Warshel, A.; Štrajbl, M.; Villá, J.; Florián, J. *Biochemistry* **39(48)**, 2000, 14728–14738
- [3] Bala, P.; Grochowski, P.; Nowinski, K.; Lesyng, B.; McCammon, J.A. *Bioph.* **79(3)**, 2000, 1253–1262
- [4] Bruice, T.C.; Kahn, K. *Curr. Opinion in Chem. Biol.* **4**, 2000, 540–544
- [5] Kędzierski, P.; Moreton, K.; Clarke, A.R.; Holbrook, J.J. *Biochemistry* **40(24)**, 2001, 7247–7252
- [6] Náray-Szabó, G.; Warshel, A. „*Computational Approaches to Biochemical Reactivity*”; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, 1997, Chapter 6.
- [7] Sokalski, W.A.; Roszak, S.; Pecul, K. *Chem. Phys. Lett.* **153(2–3)**, 1988, 153–159
- [8] Almlof, J.; Faegri, K.; Korsell, K. *J. Comp. Chem.* **3(3)**, 1982, 385–399
- [9] Car, R.; Parrinello, M. *Phys. Rev. Lett.* **55(22)**, 1985, 2471–2474
- [10] Rothlisberger, U.; Carloni, P. *Int. J. Quantum Chem.* **73(2)**, 1999, 209–218
- [11] Rothlisberger, U.; Carloni, P.; Doclo, K.; Parrinello, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5(2)**, 2000, 236–250
- [12] Piana, S.; Carloni, P. *Prot. Struc. Func. Gen.* **39(1)**, 2000, 26–36
- [13] Svensson, M.; Humbel, S.; Froese, R.D.J.; Matsubara, T.; Sieber, S.; Morokuma, K. *J. Phys. Chem.* **100(50)** 1996, 19357–19363
- [14] Day, P.N.; Jansen, J.H.; Gordon, M.S.; Webb, S.P.; Stevens, W.J.; Krauss, M.; Garmer D.; Cohen, D. *J. Chem. Phys.* **105(5)**, 1996, 1968–1986

- [15] Lyne, P.D.; Hodoscek, M.; Karplus, M. *J. Phys. Chem. A* **103(18)**, 1999, 3462–3471
- [16] Gogonea, V.; Suarez, D.; van der Vaart, A.; Merz, K.W. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **11(2)**, 2001, 217–223
- [17] Daniels, A.D.; Scuseria, G.E.; Farkas, O.; Schlegel, H.B. *Int. J. Quantum Chem.* **77(1)**, 2000, 82–89
- [18] Simonson, T. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **11(2)**, 2001, 243–252
- [19] Warshel, A. „*Computer Modelling Of Chemical Reactions In Enzymes And Solutions*”, John Wiley & Sohns, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto and Singapore, 1991
- [20] Villá, J.; Štrajbl, M.; Glennon, T.M.; Sham, Y.Y.; Chu, Z.T.; Warshel, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97(22)**, 2000, 11899–11904
- [21] Warshel, A.; *J. Biol. Chem.* **273(42)**, 1998, 27035–27038
- [22] Gutowski, M.; Chałasiński, G. *J. Chem. Phys.* **98(7)**, 1993, 5540–5553
- [23] van Duijneveldt, F.B.; van Duijneveldt–van de Rijdt, J.G.C.M.; van Lenthe, J.H. *Chem. Rev.* **94(7)**, 1994, 1873–1885
- [24] Bukowski, R.; Jeziorski, B.; Szalewicz, K. *J. Chem. Phys.* **104(9)**, 1996, 3306–3317
- [25] Szalewicz, K.; Jeziorski, B. „*Molecular Interactions: From van der Waals to Strongly Bound Complexes*” (Ed. S. Scheiner), Wiley, Chichester, 1997, Chapter 1.
- [26] Boys, S.F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **19**, 1970, 553–556
- [27] Davidson, E.R.; Chakravorty, S.J. *Chem. Phys. Lett.* **217(1–2)**, 1994, 48–54
- [28] Liedl, K.R. *J. Chem. Phys.* **108(8)**, 1998, 3199–3204
- [29] Mayer, I.; Valiron, P. *J. Chem. Phys.* **109(9)**, 1988, 3360–3373
- [30] Halkier, A.; Klopper, W.; Helgaker, T.; Jorgensen, P.; Taylor, P.R. *J. Chem. Phys.* **111(20)**, 1999, 9157–9167
- [31] Salvador, P.; Simon, S.; Duran, M.; Dannenberg, J.J. *J. Chem. Phys.* **113(14)**, 2000, 5666–5674

- [32] Paizs, B.; Salvador, P.; Csaszar, A.G.; Duran, M.; Suhai, S. *J. Comp. Chem.* **22(2)**, 2001, 196–207
- [33] Salvador, P.; Paizs, B.; Duran, M.; Suhai, S. *J. Comp. Chem.* **22(7)**, 2001, 765–786
- [34] Kollman, P.A.; Allen, L.C.; *Theor. Chim. Acta* **18**, 1970, 399–403
- [35] Urban, M.; Hobza, P. *Theor. Chim. Acta* **36**, 1975, 215
- [36] Kitaura, K.; Morokuma, K. *Int. J. Quantum Chem.* **10**, 1976, 325–340
- [37] Chen, W.; Gordon, M.S. *J. Phys. Chem.* **100(34)**, 1996, 14316–14328
- [38] Cammi, R.; Bonaccorsi, R.; Tomasi, J. *Theor. Chim. Acta* **68**, 1985, 271–283
- [39] Stevens, W.J.; Fink, W.H. *Chem. Phys. Lett.* **139(1)**, 1987, 15–22
- [40] Sokalski, W.A.; Roszak, S. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **80**, 1991, 387–400
- [41] Stone, A.J. *Chem. Phys. Lett.* **211(1)**, 1993, 101–109
- [42] Becke, A.D. *J. Chem. Phys.* **98(7)**, 1993, 5648–5652
- [43] Mijoule, C.; Latajka, Z.; Borgis, D. *Chem. Phys. Lett.* **208(5–6)**, 1993, 364–368
- [44] Novoa, J.J.; Sosa, C. *J. Phys. Chem.* **99(43)**, 1995, 15837–15845
- [45] Wei, D.Q., Proynov, E.I., Milet, A., Salahub, D.R. *J. Phys. Chem. A* **104(11)**, 2000, 2384–2395
- [46] Perdew, J.P.; Chevary, J.A.; Vosko, S.H.; Jackson, K.A.; Pederson, M.R.; Singh, D.J.; Fiolhais, C. *Phys. Rev. B* **46(11)**, 1992, 6671–6687
- [47] Hobza, P.; Sponer, J.; Reschel, T. *J. Comp. Chem.* **16(11)**, 1995, 1315–1325
- [48] Tsuzuki, S.; Luthi, H.P. *J. Chem. Phys.* **114(9)**, 2001, 3949–3957
- [49] Elstner, M.; Hobza, P.; Frauenheim, T.; Suhai, S.; Kaxiras, E. *J. Chem. Phys.* **114(12)**, 2001, 5149–5155
- [50] Saebo, S.; Pulay, P. *Ann. Rev. of Phys. Chem.* **44**, 1993, 213–236
- [51] Saebo, S.; Tong, W.; Pulay, P. *J. Chem. Phys.* **98(3)**, 1993, 2170–2175

- [52] Schutz, M.; Rauhut, G.; Werner, H.J. *J. Phys. Chem. A* **102(29)**, 1998, 5997–6003
- [53] Hirschfelder, J.O.; Silbey, R. *J. Chem. Phys.* **45**, 1966, 2188–2192
- [54] Jeziorski, B.; Kołos, W. *Int. J. Quantum Chem.* **12(1)**, 1977, 91–117
- [55] Jeziorski, B.; Chałasiński, G.; Szalewicz, K. *Int. J. Quantum Chem.* **14**, 1978, 271–287
- [56] Chałasiński, G.; Szczeniński, M.M. *Chem. Rev.* **100(11)**, 2000, 4227–4252
- [57] Noga, J.; Bartlett, R.J. *J. Chem. Phys.* **86(12)**, 1987 7041–7050
- [58] Sokalski, W.A.; Roszak, S.; Hariharan, P.C.; Kaufman, J.J. *Int. J. Quantum Chem.* **23(3)**, 1983, 847–854
- [59] Moszyński, R.; Jeziorski, B.; Rybak, S.; Szalewicz, K.; Williams, H.L. *J. Chem. Phys.* **100(7)**, 1994, 5080–5092
- [60] Sokalski, W.A.; Kędzierski, P.; Grembecka, J.; Dziekoński P. i Strasburger, K. „*Computational Molecular Biology*” pod edycją J. Leszczyńskiego, Elsevier-Science 1999, vol. 8, Rozdział 10, 369–396
- [61] Convay, A.; Murrell, J.N. *Mol. Phys.* **23**, 1972, 1143
- [62] Schmidt, K.W.; Balridge, K.K.; Boatz, J.A.; Elbert, S.T.; Gordon, M.S. Jensen, J.H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K.A.; Su, S.J.; Windus, T.L.; Dupuis, M.; Montgomery, J.A. *J. Comp. Chem.* **14(11)**, 1993, pp. 1347–1363
- [63] Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.G.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Keith, T.; Petersson, G.A.; Montgomery, J.A.; Raghavachari, K.; Al-Laham, M.A.; Zakrzewski, V.G.; Ortiz, J.V.; Foresman, J.B.; Ciosłowski, J.; Stefanov, B.B.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Peng, C.Y.; Ayala, P.Y.; Chen, W.; Wong, M.W.; Andres, J.L.; Replogle, E.S.; Gomperts, R.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Binkley, J.S.; Defrees, D.J.; Baker, J.; Stewart, J.P.; Head-Gordon, M.; Gonzales, C. and Pople, J.A. *Gaussian 94 Revision E.2*, Gaussian Inc., Pittsburgh PA, 1995
- [64] Williams, H.L.; Mas, E.M.; Szalewicz, K.; Jeziorski, B. *J. Chem. Phys.* **103(17)**, 1995, 7374–7391

- [65] Melo, A.; Ramos, M.J. *Int. J. Quantum Chem.* **72(3)**, 1999, 157–176
- [66] Korchowiec, J.; Uchimaru, T. *J. Chem. Phys.* **112(4)**, 2000, 1623–1633
- [67] Mo, Y.R.; Gao, J.L.; Peyerimhoff, S.D. *J. Chem. Phys.* **112(13)**, 2000, 5530–5538
- [68] Fischer, E. *Ber. Dt. Chem. Ges.* **27**, 1894, 2985
- [69] Pauling, L. *Chem. Eng. News* **24**, 1946, 1375–1377
- [70] Phillips, D.C. *Sci. Am.* **215(5)**, 1966, 75–80
- [71] Storm, D.R.; Koshland, D.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66**, 1970, 445–457
- [72] Náray-Szabó, G. *J. Am. Chem. Soc.* **106(16)**, 1984, 4584–4589
- [73] Náray-Szabó, G.; Nagy, P. *Enzyme* **36(1–2)**, 1986, 44–53
- [74] Chau, P.L.; Dean, P.M. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **8(5)**, 1994, 513–525, 527–544
i 545–564
- [75] Warshel, A.; Florián, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95(11)**, 1998, 5950–5955
- [76] Jencks, W.P. „*Catalysis in Chemistry and Enzymology*”, Dover, New York, 1987
- [77] Fersht, A.R. „*Structure and Mechanism in Protein Science: a Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*”, W.H. Freeman and Co., New York 1999
- [78] Warshel, A.; Levitt, M. *J. Mol. Biol.* **103**, 1976, 227–249
- [79] Marcus, R.A. *Angew. Chem.* **32(8)**, 1993, 1111–1222
- [80] Marcus, R.A. *J. Phys. Chem. A* **101(22)**, 1997, 4072–4087
- [81] Khanjin, N.A.; Snyder, J.P.; Menger, F.M. *J. Am. Chem. Soc.* **121(50)**, 1999, 11831–11846
- [82] Warshel, A. *Theor. Chem. Acc.* **103(3–4)**, 2000, 337–339
- [83] Perrin C.L.; Nielson J.B. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **48**, 1997, 511–544
- [84] Cleland, W.W.; Frey, P.A.; Gerlt, J.A. *J. Biol. Chem.* **273(40)**, 1998, 25529–25532
- [85] Cummins, P.L.; Gready, J.E. *J. Mol. Graph. Mod.* **18(1)**, 2000, 42–49

- [86] Cassidy, C.S.; Lin, J.; Frey, P.A. *Bioch. Bioph. Res.* **273(2)**, 2000, 789–792
- [87] Bruice, T.C.; Brown, A.; Harris, D.O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 1971, 658–661
- [88] Mesecar, A.D.; Stoddard, B.L.; Koshland, D.E.(Jr.) *Science* **277**, 1997, 202–206
- [89] Kast, P.; Asif-Ullah, M.; Hilvert, D. *Tetrahedron Lett.* **37(16)**, 1996, 2691–2694
- [90] Štrajbl, M.; Sham, Y.Y.; Villá, J.; Chu, Z.T.; Warshel, A. *J. Phys. Chem. B* **104(18)**, 2000, 4578–4584
- [91] Mader, M.M.; Bartlett, P.A. *Chem. Rev.* **97(5)**, 1997, 1281–1301
- [92] Symposium Report „*The Role of Electrostatic in Chemistry*”, org. Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. *Theor. Chem. Acc.* **98(4)**, 1997, 206–211
- [93] Warshel, A.; Papazyan, A. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **8(2)**, 1998, 211–217
- [94] Náray-Szabó, G. *Period. Biol.* **101(4)**, 1999, 325–331
- [95] Ma, B.; Sandeep, K.; Tsai, C.J.; Hu, Z.; Nussinov, R. *J. Theor. Biol.* **203(4)**, 2000, 383–397
- [96] Perutz, M.F. *Science* **201**, 1978, 1187
- [97] Motherwell, W.B.; Bingham, M.J.; Six, Y. *Tetrahedron* **57(22)**, 2001, 4663–4686
- [98] Stewart, J.D.; Benkovic, S.J. *Nature* **375**, 1995, 388–391
- [99] Cornell, W.D.; Cieplak, P.; Bayly, C.I.; Gould, I.R.; Merz, K.M.; Ferguson, D.M.; Spellmeyer, D.C.; Fox, T.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A. *J. Am. Chem. Soc.* **117(19)**, 1995, 5179–5197
- [100] Halgren, T.A. *J. Comp. Chem.* **17(5–6)**, 1996, 520–552
- [101] MacKerell, A.D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R.L.; Evanseck, J.D.; Field, M.J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F.T.K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D.T.; Prodhom, B.; Reiher, W.E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J.C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiórkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. *J. Phys. Chem. B* **102(18)**, 1998, 3586–3616

- [102] Bader, R.F. „*Atoms in Molecules: A Quantum Theory*”, Clarendon Press, Oxford, U.K., 1990
- [103] Kosov, D.S.; Popelier, P.L.A. *J. Phys. Chem. A* **104(31)**, 2000, 7339–7345
- [104] Walker, P.D.; Mezey, P.G. *J. Am. Chem. Soc.* **115(26)**, 1993, 12423–12430
- [105] Mezey, P.G. *Top. Curr. Chem.* **203**, 1999, 167–186
- [106] Walker, P.D.; Mezey, P.G. *J. Comp. Chem.* **16(10)**, 1995, 1238–1249
- [107] Francl, M.M.; Chirlian, L.E. *J. Comp. Chem.* **8(6)**, 1987, 894–905
- [108] Singh, U.C.; Kollman, P.A. *J. Comp. Chem.* **5(2)**, 1984, 129–145
- [109] Bayly, C.I.; Cieplak, P.; Cornell, W.D.; Kollman, P.A. *J. Phys. Chem.* **97(40)**, 1993, 10269–10280
- [110] Besler, B.H.; Merz, K.M.; Kollman, P.A. *J. Comp. Chem.* **11(4)**, 1990, 431–439
- [111] Spackman, M.A. *J. Comp. Chem.* **17(1)**, 1996, 1–18
- [112] Francl, M.M.; Carey, C.; Chirlian, L.E.; Gange, D.M. *J. Comp. Chem.* **17(3)**, 1996, 367–383
- [113] Cornell, W.D.; Cieplak, P.; Bayly, C.I.; Kollman, P.A. *J. Am. Chem. Soc.* **115(21)**, 1993, 9620–9631
- [114] Francl, M.M.; Chirlian, L.E. *Rev. Comp. Ch.* **14**, 2000, 1–31
- [115] Stern, H.A.; Kaminski, G.A.; Banks, J.L.; Zhou, R.; Berne, B.J.; Friesner, R.A. *J. Phys. Chem. B* **103(22)**, 1999, 4730–4737
- [116] Lamoureux, G.; Allouche, D.; Souaille, M.; Roux, B. *Biophys. J.* **78(1)**, 2000, 1952
- [117] Bret, C.; Field, M.J.; Hemmingsen, L. *Mol. Phys.* **98(11)**, 2000, 751–763
- [118] Roterman, I.K.; Lambert, M.H.; Gibson, K.D.; Scheraga, H.A. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **7(3)**, 1989, 421–453
- [119] Beachy, M.D.; Chasman, D.; Murphy, R.B.; Halgren, T.A.; Friesner, R.A. *J. Am. Chem. Soc.* **119(25)**, 1997, 5908–5920
- [120] Williams, D.E. *J. Comp. Chem.* **15(7)**, 1994, 719–732

- [121] Rein, R. *Adv. Quantum Chem.* **7**, 1972, 335–397
- [122] Stone, A. *Chem. Phys. Lett.* **83(2)**, 1981, 233–239
- [123] Sokalski, W.A.; Poirier, R.A. *Chem. Phys. Lett.* **98(1)** 1983, 86–92
- [124] Sokalski, W.A.; Shibata, M.; Ornstein, R.; Rein, R. *J. Comp. Chem.* **13(7)**, 1992, 883–887
- [125] Sokalski, W.A.; Lai, J.; Luo, N.; Sun, S.; Shibata, M.; Ornstein, R.; Rein, R. *Int. J. Quantum Chem. Quantum Biol. Symp.* **18**, 1991, 61–71
- [126] Strasburger, K; Sokalski, W.A. *Chem. Phys. Lett.* **221(1–2)**, 1994, 129–135
- [127] Spackman, M.A. *J. Chem. Phys.* **85(11)**, 1986, 6587–6601
- [128] Sokalski, W.A.; Sawaryn, A. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **88**, 1992, 91–112
- [129] Lecomte, C.; Ghermani, N.E.; Pichon-Pesme, V.; Souhassou, M. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **255**, 1992, 241–260
- [130] Bouhmaida, N.; Ghermani, N.E.; Lecomte, C.; Thalal, A. *Acta Cryst.* **A53**, 1997, 556–563
- [131] Pichon-Pesme, V.; Lecomte, C.; Lachekar, H. *J. Phys. Chem.* **99(16)**, 1995, 6242–6250
- [132] Jelsch, C.; Teeter, M.M.; Lamzin, V.; Pichon-Pesme, V.; Blessing, R.H.; Lecomte, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97(7)**, 2000, 3171–3176
- [133] Malcolm, N.O.J.; Hindle, S.A.; Burton, N.A., „Anisotropic Electrostatics For QM/MM Calculations”, Fifth World Congress of Theoretically Oriented Chemists WATOC ‘99, Imperial College, London, U.K.; 1–6 sierpnia, 1999
- [134] Chen, W.; Gordon, M.S. *J. Chem. Phys.* **105(24)**, 1996, 11081–11090
- [135] Kędzierski, P.; Sokalski, W.A.; Krauss, M. *J. Comp. Chem.* **21(6)**, 2000, 432–445
- [136] Grembecka, J.; Kędzierski, P.; Sokalski, W.A.; Leszczyński, J. *Int. J. Quantum Chem.* **83(3–4)**, 2001, 180–192
- [137] Sokalski, W.A. *J. Mol. Catal.* **30(3)**, 1985, 395–410

- [138] Voet, D.; Voet, J.G. „*Biochemistry*”, John Wiley & Sohns, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1990
- [139] Sim, F.; Salahub, D.R.; Chin, S. *Int. J. Quantum Chem.* **43(4)**, 1992, 463–479
- [140] Stamant, A.; Cornell, W.D.; Kollman, P.A. *J. Comp. Chem.* **16(12)**, 1995, 1483–1506
- [141] Foresman, J.B.; Head-Gordon, M.; Pople, J.A.; Frisch, M.J. *J. Phys. Chem.* **96(1)**, 1992, 135–149
- [142] Mulliken, R.S. *J. Chem. Phys.* **23**, 1955, 1833–1846
- [143] Wang, J.M.; Cieplak, P.; Kollman, P.A. *J. Comp. Chem.* **21(12)**, 2000, 1049–1074
- [144] Connolly, M.L. *Science* **221**, 1983, 709–713
- [145] Pauling, L. *Nature Chem. Bond.* 1939, 178
- [146] Bondi, A. *J. Phys. Chem.* **68**, 1964, 441
- [147] Nowek, A. modyfikacja programu GAMESS (1997)
- [148] Góra, R.W. modyfikacja programu GAMESS (2000)
- [149] Computational results obtained using software programs from Biosym Technologies of San Diego: molecular mechanics calculations using Discover and Insight II version 2.2.0, San Diego, Biosym Technologies 1993 (obecnie Accelrys Inc.)
- [150] Schaftenaar, G.; Noordik, J.H. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **14(2)**, 2000, 123–134
- [151] Kraulis, P.J. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 1991, 946–950
- [152] Koradi, R.; Billeter, M.; and Wüthrich, K. *J. Mol. Graphics* **14(1)**, 1996, 51–55
- [153] *Gnuplot 3.7 — An Interactive Plotting Program*, Copyright ©1986–1993, 1998 Thomas Williams, Colin Kelley
- [154] Raines, R.T. *Chem. Rev.* **98(3)** 1998, 1045–1065
- [155] Wladkowski, B.D.; Krauss, M.; Stevens, W.J. *J. Phys. Chem.* **99(17)**, 1995, 6273–6276
- [156] Glennon, T.M.; Warshel, A. *J. Am. Chem. Soc.* **120(39)** 1998, 10234–10247

- [157] Gerlt, J.A.; Gassman, P.G. *Biochemistry* **32(45)** 1993, 11943–11952
- [158] Breslow, R.; Xu, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90(4)** 1993, 1201–1207
- [159] Romero, R.M.; Roberts, M.F.; Phillipson, J.D. *Phytochemistry* **40(4)**, 1995, 1015–1025
- [160] Ganem, B. *Angew. Chem.* **35(9)**, 1996, 937–945
- [161] Chook, Y.M.; Gray, J.V.; Ke, H.; Lipscomb, W.N. *J. Mol. Biol.* **240(5)**, 1994, 476–500
- [162] Marti, S.; Andres, J.; Moliner, V.; Silla, E.; Tuñón, I.; Bertrán, J. *Theor. Chem. Acc.* **105(3)**, 2001, 207–212
- [163] Worthington, S.E.; Krauss, M. *Comput. Chem.* **24(3–4)**, 2000, 275–285
- [164] Marti, S.; Andres, J.; Moliner, V.; Silla, E.; Tunon, I.; Bertran, J.; Field, M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **123(8)**, 2001, 1709–1712
- [165] Marti, S.; Andres, J.; Moliner, V.; Silla, E.; Tunon, I.; Bertran, J. *Theor. Chem. Acc.* **105(3)**, 2001, 207–212
- [166] Worthington, S.E.; Roitberg, A.E.; Krauss, M. (praca w przygotowaniu); patrz *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* **220** 2000, 158
- [167] Addadi, L.; Jaffe, E.K.; Knowles, J.R. *Biochemistry* **22(19)**, 1983, 4494–4501
- [168] Gustin, D.J.; Mattei, P.; Kast, P.; Wiest, O.; Lee, L.; Cleland, W.W.; Hilvert, D. *J. Am. Chem. Soc.* **121(8)**, 1999, 1756–1757
- [169] Kast, P.; Asif-Ullah, M.; Jiang, N.; Hilvert, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93(10)**, 1996, 5043–5048
- [170] Lyne, P.D.; Mulholland, A.J.; Richards, W.G. *J. Am. Chem. Soc.* **117(45)**, 1995, 11345–11350
- [171] Jackson, D.Y.; Liang, M.N.; Bartlett, P.A.; Schultz, P.G. *Angew. Chem.* **31(2)**, 1992, 182–183
- [172] Wiener, J.J.M.; Grice, M.E.; Murray, J.S.; Politzer, P. *J. Chem. Phys.* **104(13)**, 1996, 5109–5111

- [173] Apaya, R.P.; Bondi, M.; Price, S.L. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **11(5)**, 1997, 479-490
- [174] Bentley, J. *J. Phys. Chem. A* **102(29)**, 1998, 6043-6051
- [175] Stone, A. *Mol. Phys.* **56(5)**, 1985, 1065-1082
- [176] Price, S.L.; Faerman, C.H.; Murray, C.W. *J. Comp. Chem.* **12(10)**, 1991, 1187-1197
- [177] Price, S.L.; Stone, A.J. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **88(13)**, 1992, 1755-1763
- [178] Koch, U.; Popelier, P.L.A.; Stone, A.J. *Chem. Phys. Lett.* **238(4-6)**, 1995, 253-260
- [179] Koch, U.; Stone, A.J. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **92(10)**, 1996, 1701-1708
- [180] Stone, A.J. *ORIENT: A program for calculating electrostatic interactions*, University of Cambridge, 1994
- [181] Kędzierski, P.; Sokalski, W.A. *J. Comp. Chem.* **20(10)**, 2001, 1082-1097
- [182] Ramachandran, G.N.; Sasisekharan, V. *Adv. Protein Chem.* **23**, 1968, 332
- [183] Halgren, T.A.; Damm, W. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **11(2)**, 2001, 236-242
- [184] Dziekoński, P.; Sokalski, W.A.; Kassab, E.; Allavena, M. *Chem. Phys. Lett.* **288(2-4)**, 1998, 538-544
- [185] Sokalski, W.A.; Kędzierski, P.; Grembecka, J. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **3(5)**, 2001, 657-663
- [186] Sokalski, W.A.; Maruszewski, K.; Hariharan, P.C.; Kaufman, J.J., *Int. J. Quantum Chem. Quantum Biol. Symp.* **16**, 1989, 119-164
- [187] Sokalski, W.A.; Shibata, M.; Barak, D.; Rein, R. *J. Mol. Evol.* **33**, 1991, 405-411
- [188] Fersht, A.R.; Wells, T.N.C. *Prot. Eng.* **4(3)**, 1991, 229-231
- [189] Nash, P.; McFadden, G.; Whitty, A. *FEBS Lett.* **475(1)**, 2000, 1-6
- [190] Sternberg, M.J.E.; Hayes, F.R.F.; Russell, A.J.; Thomas, P.G.; Fersht, A.R. *Nature* **330**, 1987, 86-88
- [191] Russell, A.J.; Thomas, P.G.; Fersht, A.R. *J. Mol. Biol.* **193(4)**, 1987, 803-813

- [192] García-Moreno, B.E.; Dwyer, J.J.; Gittis, A.G.; Lattman, E.E.; Spencer, D.S.; Stites, W.E. *Biophys. Chem.* **64(1–3)**, 1997, 211–224
- [193] Grembecka, J.; Sokalski, W.A.; Kafarski, P. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **14(6)**, 2000, 531–544
- [194] Grembecka, J. praca doktorska „*Inhibitory leucyloaminopeptydazy*”, Politechnika Wrocławska, Wrocław 2000
- [195] Sträter, N.; Lipscomb, W.N. *Biochemistry* **34(28)**, 1995, 9200–9210
- [196] Taylor, A. *Trends Biochem. Sci.* **18(5)**, 1993, 167–172
- [197] Taylor, A. *FASEB J.* **7(2)**, 1993, 290–298
- [198] Sträter, N.; Lipscomb, W.N. *Biochemistry* **34(45)**, 1995, 14792–14800
- [199] Giannousis, P.P.; Bartlett, P.A. *J. Med. Chem.* **30(9)**, 1987, 1603–1609
- [200] Lejczak, B.; Kafarski, P.; Zygmunt, J. *Biochemistry* **28(8)**, 1989, 3549–3555
- [201] Grembecka, J.; Kędzierski, P.; Sokalski, W.A. *Chem. Phys. Lett.* **313(1–2)**, 1999, 385–392
- [202] Arnez, J.G., Moras, D. *Trends Biochem. Sci.* **22(6)**, 1997, 211–216
- [203] Cusack, S. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **7(6)**, 1997, 881–889
- [204] Sokalski, W.A.; Kędzierski, P.; Leszczyński, J. ISQBP Zerner Conference, „*Theoretical Determination of Catalytic Residues of Class I and II Aminoacyl t-RNA synthetases*”, August 17–19, 2000, New Orleans, Louisiana.
- [205] Chelli, R.; Procacci, P.; Righini, R.; Califano, S. *J. Chem. Phys.* **111(18)**, 1999, 8569–8575

Dodatek A

Wykaz stosowanych skrótów

aa-AMP aminoacylowany adenozymonofosforan (aktywowana forma aminokwasu w syntezie aa-tRNA)

aa-tRNA aminoacylowany tRNA, cząsteczka rozpoznająca specyficznie kodon DNA i przenosząca odpowiedni aminokwas (aa)

AIM *atoms in molecules*, metoda topologicznej analizy gęstości elektronowej [102]

AIMD *ab initio molecular dynamics*

AO *atomic orbitals*

ATP adenozynotrójfosforan

B3LYP metoda funkcjonału gęstości wg Lee, Yanga i Parra, z korektą wymiany wg. Becke [42]

BSSE błąd superpozycji bazy, *basis set superposition error*

CAMM atomowe rozwinięcie multipolowe [123], *cumulative atomic multipole moments*

CC *coupled clusters*, metoda sprzężonych klastrów uwzględnienia korelacji elektronowej

CMMM wielocentrowe rozwinięcie multipolowe [128], *cumulative multicenter multipole moments*

CP metoda korekty błędu BSSE wg Boysa i Bernardiego [26] (*counterpoise correction*)

CPE metoda opisu polaryzowalności przez wyrównanie potencjału chemicznego atomów lub grup; *chemical potential equalization*

DEM różnicowy efekt modyfikacji (w sensie zmian w energii oddziaływań), najczęściej w odniesieniu do mutacji enzymu; *differential effect of modification*

DFT teoria funkcjonału gęstości (również oznaczenie metod), *density functional theory*

DMA *distributed multipole analysis*, metoda uzupełnienia analizy populacyjnej Mullikena wielocentrowym rozwinięciem multipolowym zaproponowana przez Stone'a [122]

DTSS różnicowa energia stabilizacji stany przejściowego względem kompleksu substratów, *differential transition state stabilization*

EFP *effective fragment potential*, metoda QM/MM opisująca środowisko reakcji za pomocą potencjału fragmentów opisywanych rozkładem DMA z parametrycznym uwzględnieniem wymiany i polaryzowalności [14]

ENTS Oznaczenia (ENTS, EXTS, I1–3, P, PTTS1–3, R1–2) struktur na ścieżce reakcji przeprowadzanej przez rybonukleazę A. Patrz rysunek 3.3 oraz [1, 135]

ET *exponent-truncated series*, przybliżenie pełnego szeregu multipolowego wyrazami o tej samej zależności od odległości

EVB *empirical valence bond*, półempiryczna metoda wiązań walencyjnych umożliwiająca przybliżony opis reakcji chemicznych w dużych układach [19]

EXTS patrz: ENTS

FEP *free energy perturbation*, metoda umożliwiająca oszacowanie zmian energii swobodnej układu metodami empirycznymi (MD)

FF *forcefield*, empiryczna (parametryczna) funkcja pozwalająca opisać mikroskopowo energię układu (PES) w przybliżeniu klasycznym; pole siłowe

GSD *ground state destabilization*, koncepcja wyjaśniająca mechanizm obniżania przez enzym bariery aktywacji reakcji drogą destabilizacji substratów

HF metoda Hartree-Focka

His δ , ϵ W odniesieniu do neutralnej histydyny, symbolami δ i ϵ oznaczano pozycję protonu (przy atomie N δ lub N ϵ)

I1, I2, I3 patrz: ENTS

LAP aminopeptydaza leucylowa (*leucine aminopeptidase*)

LBHB wiązanie wodorowe o niskiej barierze przeniesienia protonu (*low barrier hydrogen bond*)

LCAO MO przybliżenie funkcji falowej układu (orbitali molekularnych, MO) liniową kombinacją orbitali atomowych (*linear combination of atomic orbitals*)

LFER *linear free energy relationships*, postulowana liniowa zależność energii swobodnej oddziaływań w centrum aktywnym od efektów modyfikacji (np. mutacji) w otoczeniu [77]

LMP2 metoda Möller-Plesset z lokalizacją [51]

MC metoda statystycznego modelowania termodynamiki układu (*Monte Carlo*)

MD metoda modelowania dynamiki układu w przybliżeniu klasycznych równań ruchu (*molecular dynamics*)

MEP molekularny potencjał elektrostatyczny, *molecular electrostatic potential*

MM mechanika molekularna, ogólne oznaczenie metod wykorzystujących empiryczną funkcję energii układu (FF)

MP2 metoda Möller-Plesset wykorzystująca rachunek zaburzeń z poprawkami drugiego rzędu do opisu korelacji elektronowej

MSK ładunki PDC otrzymane metodą Merz-Singh-Kollmana [110]

MT *moment-truncated series*, przybliżenie pełnego szeregu multipolowego przez uwzględnienie wszystkich wyrazów zależnych od momentów zadanego rzędu

NAC konformer kompleksu substratów bliski strukturze stanu przejściowego, *near attack conformer*

NMA N-metyloacetamid

ONIOM metoda QM/MM zaproponowana przez Morokumę i współpracowników; *Our own N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics approach*) [13]

OS *orbital steering*, koncepcja wyjaśniająca efektywność katalizy enzymatycznej przez optymalne nakładanie orbitali

P patrz: ENTS

PDB *Protein Data Bank*, baza danych struktur białkowych,
<http://www.rcsb.org/pdb/>

PDC ładunki atomowe dobrane dla najlepszego (w sensie średniego odchylenia kwadratowego) odtwarzania potencjału elektrostatycznego cząsteczki (*potential derived charges*)

PES hiperpowierzchnia energii potencjalnej układu (*potential energy surface*)

PTTS1, PTTS2, PTTS3 patrz: ENTS

QM *quantum mechanics*

QM/MM popularne oznaczenie hybrydowych metod łączących nieempiryczny opis centrum reakcji (QM) z klasycznym, empirycznym (MM) opisem otoczenia

R1, R2 patrz: ENTS

RESP *restrained electrostatic potential derived charges*, metoda obliczania ładunków PDC z dodatkowymi więzami [109]

RHF *restricted Hartree-Fock*, metoda Hartree-Focka dla stanów zamkniętopowłokowych

RNA kwas rybonukleinowy

RRMS *relative root mean square error*, unormowana miara średniego odchylenia kwadratowego używana w badaniach odtwarzana MEP

SAPT *symmetry adapted perturbation theory*, wariant rachunku zaburzeń dla oddziaływań międzycząsteczkowych, uwzględniający antysymetrię funkcji falowej kompleksu

SAS *solvent accessible surface*, powierzchnia cząsteczki dostępna dla oddziaływań międzycząsteczkowych

SC kompleks substratów (*substrate complex*)

SCF metoda pola samouzgodnionego (*self-consistent field*), umożliwiająca iteracyjne obliczenie funkcji falowej i energii układu

tRNA kwas rybonukleinowy odpowiedzialny za translację kodu DNA na sekwencję aminokwasów, służący do przenoszenia aktywowanego aminokwasu (*transfer RNA*)

TS stan przejściowy (*transition state*)

Dodatek B

Spis rysunków

| | | |
|------|--|----|
| 2.1 | Model inhibicji enzymatycznej. | 25 |
| 2.2 | Ilustracja stabilizacji stanu przejściowego w katalizie enzymatycznej. | 26 |
| 2.3 | Ilustracja wpływu modyfikacji enzymu (np. mutacji) na wiązanie ligandu. | 27 |
| 2.4 | Powierzchnia kontaktowa cząsteczki | 32 |
| 3.1 | Struktura przestrzenna rybonukleazy A | 35 |
| 3.2 | Schemat reakcji hydrolizy kwasu rybonukleinowego przez rybonukleazę A | 35 |
| 3.3 | Mechanizm reakcji transfosforylacji katalizowanej przez rybonukleazę A | 37 |
| 3.4 | Diagram energii ścieżki reakcji katalizowanej przez rybonukleazę A | 38 |
| 3.5 | Diagram względnych udziałów katalitycznych reszt centrum aktywnego rybonukleazy A | 42 |
| 3.6 | Wykresy zależności od odległości składowych energii oddziaływań histydyny 119 δ z różnymi reagentami | 44 |
| 3.6 | kontynuacja | 45 |
| 3.6 | kontynuacja | 46 |
| 3.7 | Analiza zależności od odległości składowych Δ^{DTSS} stabilizacji przez histydynę 119 δ | 47 |
| 3.7 | kontynuacja | 48 |
| 3.8 | Przegrupowanie Claisena katalizowane przez mutazę choryzmianową. | 49 |
| 3.9 | Centrum aktywne mutazy choryzmianowej | 50 |
| 3.10 | Składowe Δ^{DTSS} dla wybranych reszt centrum aktywnego mutazy choryzmianowej | 52 |
| 4.1 | Pozycje wiązań wodorowych grupy peptydowej | 54 |
| 4.2 | Potencjały elektrostatyczne w pozycjach wiązań wodorowych biblioteki aminokwasów: korelacja CAMM i SCF | 55 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.3 | Potencjały elektrostatyczne w pozycjach wiązań wodorowych biblioteki aminokwasów: korelacja CAMM i DFT | 56 |
| 4.4 | Błędy $RRMS_V$ na powierzchniach kontaktowych diamidów aminokwasów, obliczone na poziomie metody SCF/6-31G(d,p). | 58 |
| 4.5 | Błędy $RRMS_V$ na powierzchniach kontaktowych diamidów aminokwasów, obliczone na poziomie metody B3LYP/6-31G(d,p). | 59 |
| 4.6 | Struktury wiązań wodorowych N-metylo acetamidu (NMA) i etanolu z wodą, do badań przenośności konformacyjnej DMA i CAMM | 61 |
| 4.7 | Porównanie przenośności konformacyjnej DMA i CAMM w cząsteczce NMA | 62 |
| 4.8 | Porównanie przenośności konformacyjnej DMA i CAMM w cząsteczce etanolu | 62 |
| 4.9 | Wiązania wodorowe między diamidem diglicyny a cząsteczkami wody, z zaznaczeniem kątów rotacji konformacyjnej | 63 |
| 4.10 | Bariera rotacji dla kąta torsyjnego ψ w N'-acetylo, C'-metyloamino diglicynie (por. Rys. 4.9). | 63 |
| 4.11 | Przenośność konformacyjna CAMM na przykładzie oddziaływań diamidu diglicyny z wodą | 65 |
| 4.12 | Struktury cyklicznych heksapeptydów oraz diamidów glicyny i alaniny . . . | 67 |
| 4.13 | Przenośność uśrednionych między aminokwasami ładunków RESP oraz rozbieżność rozwinięcia CAMM opartego na tych ładunkach | 76 |
| 5.1 | Struktura przestrzenna subtylizyny 1SBT | 78 |
| 5.2 | Rozmieszczenie oraz konformacja natywnych reszt subtylizyny BPN w pozycjach 36, 64, 98, 156 i 213. | 80 |
| 5.3 | Korelacja między obliczonymi a zmierzonymi wartościami zmian pK_a w subtylizynie | 82 |
| 5.4 | Struktura przestrzenna aminopeptydazy leucylowej | 84 |
| 5.5 | Fosfonowe inhibitory aminopeptydazy leucylowej | 84 |
| 5.6 | Wykresy korelacji energii oddziaływań (MP2 i CAMM) z pK_i kilku inhibitorów aminopeptydazy leucylowej | 85 |
| 5.7 | Model centrum aktywnego aminopeptydazy leucylowej z zadokowanym fosfonowym analogiem leucyny. | 86 |
| 5.8 | Różnicowy elektrostatyczny potencjał stabilizacji stanu przejściowego reakcji adenylacji przeprowadzanej przez syntetazy aa-tRNA | 88 |
| 5.9 | Porównanie konserwatywności sekwencji syntetaz aa-tRNA klas I i II | 90 |
| 5.10 | Nałożenie aktywnych katalitycznie reszt wybranych syntetaz aa-tRNA klasy I | 91 |
| 5.11 | Nałożenie aktywnych katalitycznie reszt wybranych syntetaz aa-tRNA klasy II | 91 |

Dodatek C

Spis tabel

| | | |
|-----|--|----|
| 1.1 | Porównanie metod dekompozycji energii oddziaływań dla He ₂ | 14 |
| 1.2 | Porównanie metod dekompozycji energii oddziaływań dla H ₂ O | 14 |
| 2.1 | Promień atomowy definiujący powierzchnię kontaktową cząsteczki. | 32 |
| 3.1 | Energie oddziaływań elektrostatycznych w centrum aktywnym rybonukleazy A | 39 |
| 3.2 | Składowe energie oddziaływań w centrum aktywnym rybonukleazy A . . . | 40 |
| 3.3 | Analiza wpływu stanu protonacji reszt na Δ^{DTSS} reakcji dla rybonukleazy A | 41 |
| 4.1 | Ładunki resztkowe przenoszonych danych CAMM alaniny i glicyny | 68 |
| 4.2 | Przeność CAMM między podobnymi otoczeniami cząsteczkowymi | 69 |
| 4.3 | Odtwarzanie wartości spodziewanych MEP na powierzchni kontaktowej badanych heksapeptydów przez model CAMM | 69 |
| 4.4 | Błędy RRMS _V przenośności fragmentów modelu rozkładu ładunku CAMM między otoczeniami cząsteczkowymi o niewielkim podobieństwie. | 70 |
| 4.5 | Błędy przenośności RRMS _V CAMM między różnymi cząsteczkami zanalizowane na poziomie poszczególnych momentów multipolowych, dzięki podmianie części rozwinięcia na oryginalne. | 72 |
| 4.6 | Test różnych metod korekty sumarycznego ładunku przeniesionego fragmentu rozkładu CAMM. | 73 |
| 4.7 | Test korekty sumarycznych momentów multipolowych przenoszonych fragmentów rozkładu CAMM. | 74 |
| 5.1 | Eksperymentalne wartości ϵ_{eff} i ΔpK_a w subtylizynie | 79 |
| 5.2 | Wartości składowych energii oddziaływań wybranych reszt subtylizyny z katalityczną histydyną 64 | 81 |
| 5.3 | Porównanie ΔpK_a obliczonych metodami o różnym stopniu przybliżenia z wartościami eksperymentalnymi | 83 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5.4 | Współczynniki korelacji energii oddziaływań z pK_i inhibitorów aminopeptydazy leucylowej | 86 |
| 5.5 | Teoretyczne przewidywanie efektów mutacji centrum aktywnego na aktywność katalityczną syntetaz aa-tRNA klasy II | 89 |