



**You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Kwantowochemiczne obliczenia właściwości strukturalnych i elektronowych oraz reaktywności klastrera A w syntazie acetylokoenzymu A

Author: Aleksandra Chmielowska

Citation style: Chmielowska Aleksandra. (2015). Kwantowochemiczne obliczenia właściwości strukturalnych i elektronowych oraz reaktywności klastrera A w syntazie acetylokoenzymu A. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersytet ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

UNIWERSYTET ŚLĄSKI
Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii



Rozprawa doktorska

**Kwantowochemiczne obliczenia właściwości
strukturalnych i elektronowych
oraz reaktywności klastra A w syntezie
acetylokoenzymu A**

Aleksandra Chmielowska

Promotor pracy
dr hab. prof. UŚ Maria Jaworska
Instytut Chemii
Zakład Chemii Teoretycznej

Katowice 2015

Pragnę serdecznie podziękować mojej promotor Pani dr hab. prof. UŚ Marii Jaworskiej za zainteresowanie mnie tematyką pracy, opiekę naukową oraz wyrozumiałość i życzliwe wsparcie podczas jej realizacji.

Dr Piotrowi Lodowskiemu dziękuję za wszechstronną pomoc oraz cenne uwagi merytoryczne, a wszystkim pracownikom Zakładu Chemii Teoretycznej za serdeczność i życzliwą atmosferę.

A. Chmielowska

Dedykuje mojej Mamie...

OBLICZENIA PROGRAMEM GAUSSIAN09 ZOSTAŁY WYKONANE WE WROCŁAWSKIM
CENTRUM SIECIOWYM I SUPERKOMPUTEROWYM, WCSS WROCŁAW
<http://www.wcss.wroc.pl> W RAMACH GRANTU OBLICZENIOWEGO NR 18

Spis treści

1	Wstęp i cel pracy	10
2	Wstęp teoretyczny	13
2.1	Metoda funkcjonałów gęstości	13
2.1.1	Twierdzenia Hohenberga-Kohna	14
2.1.2	Metoda i równania Kohna-Shama	14
2.2	Stosowane funkcjonały	16
2.3	Model rozpuszczalnika	17
2.4	Potencjały redukcji i pK_a	18
3	Syntaza acetylokoenzymu A	20
4	Dotychczasowy stan badań teoretycznych	25
5	Obliczenia własne	27
5.1	Modele obliczeniowe	28
5.2	Geometria i struktura elektronowa klastera A	32
5.2.1	Klaster A	32
5.2.2	Protonowany klaster A	38
5.2.3	Klaster A z ligandami	43
5.3	pK_a	48
5.4	Potencjały redukcji	50
5.5	Reakcja metylacji	55
5.5.1	Model strukturalny	55
5.5.2	Reakcja deprotonacji	56
5.5.3	Mechanizm A	59
5.5.4	Mechanizm B	63
5.5.5	S_N2 czy reakcja rodnikowa	66
5.5.6	Redukcyjna metylacja klastera A przez metylokobalaminę	70
6	Podsumowanie i wnioski	72
	Bibliografia	76
	Załączniki	82

Spis tablic

5.1	Wybrane, eksperymentalne parametry geometryczne klastera A	31
5.2	Energia struktur zoptymalizowanych dla modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia	35
5.3	Wybrane, zoptymalizowane odległości między atomami dla modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia	36
5.4	Gęstości spinowe i ładunki NBO dla modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia	37
5.5	Energia struktur zoptymalizowanych protonowanych modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia	40
5.6	Wybrane, zoptymalizowane odległości między atomami dla protonowanych modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia	41
5.7	Gęstości spinowe i ładunki NBO dla protonowanych modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia	42
5.8	Energia struktur zoptymalizowanych dla modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia z ligandami (-OH, -CO, -CH ₃ , -HCOO, -H)	45
5.9	Wybrane, zoptymalizowane odległości między atomami dla modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia z ligandami (-OH, -CO, -CH ₃ , -HCOO, -H)	46
5.10	Gęstości spinowe i ładunki NBO dla modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia z ligandami (-OH, -CO, -CH ₃ , -HCOO, -H)	47
5.11	Wartości pK _a obliczone dla modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia	48
5.12	Wartości potencjałów redukcji E ₀ (V, względem NHE) obliczone dla modeli klastera A	53
5.13	Zależność obliczonych wartości potencjałów redukcji E' ₀ od pH	54

Spis rysunków

2.1	Cykl termodynamiczny Borna-Habera	19
3.2	Struktura CODH\ACS	20
3.3	Wzajemna orientacja białka i klastera A w zależności od metalu skoordynowanego w miejscu M _p	22
3.4	Proponowane mechanizmy reakcji katalitycznej klastera A	23
5.5	Zastosowana w obliczeniach struktura modelowa klastera A oparta na strukturze krystalograficznej 1RU3, PDB	29
5.6	Modele klastera A stosowane w obliczeniach	32
5.7	Zoptymalizowane geometrie klastera A na różnych stopniach utlenienia dla modeli M0 i M1	33
5.8	Zoptymalizowane geometrie klastera A na różnych stopniach utlenienia dla modeli M2 i M3	34

5.9	Zoptymalizowane geometrie protonowanych struktur klastra A na różnych stopniach utlenienia	39
5.10	Zoptymalizowane geometrie klastra A z ligandami (–OH, –CO, –CH ₃) na atomie Ni _p dla modeli M1 i M3	44
5.11	Zoptymalizowane geometrie klastra A na różnych stopniach utlenienia z anionem mrówczanowym jako ligandem na atomie Ni _p dla modeli M1 i M3 oraz dla struktury z protonem	45
5.12	Zależność wartości pK _a od stałej dielektrycznej ε dla modeli klastra A stosowanych w obliczeniach	49
5.13	Zależność pierwszego i drugiego potencjału redukcji od stałej dielektrycznej ε dla modeli klastra A stosowanych w obliczeniach	50
5.14	Schemat reakcji metylacji z uwzględnieniem struktur modelowych stosowanych w obliczeniach	55
5.15	Metylokobalmina w formie "base-on" z ligandem dimetylobenzoimidazolowym	56
5.16	Krzywa energii jako funkcja odległości Ni _p -H ⁺ dla reakcji oderwania protonu przez anion mrówczanowy z zaznaczonymi strukturami substratów, produktów i stanu przejściowego	57
5.17	Panel a) krzywe energii jako funkcje odległości Ni _p -H ⁺ dla reakcji oderwania protonu przez anion mrówczanowy dla różnych stałych dielektrycznych ε; panel b) zmiana gęstości spinowych na fragmentach klastra A i anionie mrówczanowym w trakcie reakcji przeniesienia protonu	58
5.18	Krzywa energii jako funkcja odległości Ni _p -CH ₃ dla reakcji przeniesienia metylu z metylokobaltokoryny na klaster A z zaznaczonymi strukturami substratów, produktów i stanu przejściowego	60
5.19	Krzywe energii jako funkcje odległości Ni _p -CH ₃ dla reakcji przeniesienia metylu z metylokobaltokoryny na klaster A dla różnych stałych dielektrycznych ε	61
5.20	Zmiana gęstości spinowych na fragmentach klastra A, metylu i kobaltokorynie wzdłuż ścieżki reakcji o najniższej energii	62
5.21	Krzywa energii jako funkcja odległości Ni _p -CH ₃ dla reakcji przeniesienia metylu pomiędzy atomem Ni _p klastra A a metylokobaltokoryną przy stałej odległości Co-Ni _p =7 Å z zaznaczonymi strukturami substratów, produktów i stanu przejściowego	64
5.22	Panel a) krzywe energii jako funkcje odległości w reakcji przeniesienia metylu pomiędzy atomem Ni _p klastra A a metylokobaltokoryną przy ustalonej odległości Co-Ni _p =7 Å. Sytuacja taka modeluje reakcję rodnikową z przeniesieniem elektronu (ET); panel b) zmiana gęstości spinowych na fragmentach klastra A, metylu i kobaltokorynie	65
5.23	Powierzchnie energii potencjalnej zależne od dwóch parametrów geometrycznych, odległości Ni _p -CH ₃ =2.5–3.0 Å oraz odległości Co-CH ₃ =2.0–3.0 Å dla różnych stałych dielektrycznych ε	67

5.24	Powierzchnie gęstości spinowych na fragmentach klastrera A, metylu i kobaltokorynie dla dwóch odległości $Ni_p-CH_3=2.5-3.0 \text{ \AA}$ oraz $Co-CH_3=2.0-3.0 \text{ \AA}$ i różnych stałych dielektrycznych ϵ	68
5.25	Panel a) wzajemne położenie KRZYWEJ I i II dla dwóch odległości $Ni_p-CH_3=2.5-3.0 \text{ \AA}$ oraz $Co-CH_3=2.0-3.0 \text{ \AA}$; panel b) ścieżki reakcji odpowiedzialne za MECHANIZM A i MECHANIZM B	69
5.26	Proponowany schemat reakcji metylacji klastrera A	70

Wykaz stosowanych skrótów

ACS	syntaza acetylokoenzymu A (ang. <i>Acetyl-CoA Synthase</i>)
CODH	dehydrogenaza tlenku węgla (ang. <i>Carbon Monoxide Dehydrogenase</i>)
DFT	teoria funkcjonałów gęstości (ang. <i>Density Functional Theory</i>)
DFT-BS	metoda DFT z funkcją o złamanej symetrii (ang. <i>Dependent Density Functional Theory-Broken Symmetry</i>)
ET	reakcja z przeniesieniem elektronu (ang. <i>Electron Transfer</i>)
GGA	uogólnione Przybliżenie Gradientowe (ang. <i>Generalized Gradient Approximation</i>)
HOMO	najwyższy zajęty orbital molekularny (ang. <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
LDA	przybliżenie Lokalnej Gęstości (ang. <i>Local Density Approximation</i>)
LUMO	najniższy niezajęty orbital molekularny (ang. <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
MP2	metoda oparta na drugim rzędzie rachunku zaburzeń Möllera-Plesseta (ang. <i>Möllera-Plesset Perturbation Theory</i>)
NBO	metoda naturalnych orbitali wiązań (ang. <i>Natural Bond Orbital</i>)
PCM	ciągły model rozpuszczalnika (ang. <i>Polarizable Continuum Model</i>)
WFT	teoria oparta na funkcji falowej (ang. <i>Wave Function Theory</i>)
ZPE	energia punktu zerowego (ang. <i>Zero-Point Energy</i>)

1 Wstęp i cel pracy

Kompleksy metali przejściowych stanowią centra aktywne enzymów katalizujących wiele reakcji biochemicznych. Związki te mogą wykazywać zróżnicowaną reaktywność chemiczną, ze względu na łatwość z jaką metale przejściowe przyjmują różne stopnie utlenienia i różne sfery koordynacji.

Jednym z pierwiastków tworzących centra aktywne enzymów jest nikiel. Siędem z ośmiu jego enzymów katalizuje reakcje, w których produkowane lub przetwarzane są następujące gazy: CO, CO₂, CH₄, H₂, NH₃ i O₂ [1–3]. Odgrywają one ważną rolę w metabolizmie bakterii beztlenowych, obiegu węgla, azotu i wodoru w przyrodzie oraz mają ogromne znaczenie dla zrozumienia procesu powstawania życia na Ziemi. Atomy niklu w metaloenzymach wykazują dużą różnorodność koordynacji, mogą przyjmować różne stopnie utlenienia (+I,+II,+III) oraz katalizują reakcje redoks w szerokim zakresie potencjału [2]. Badanie teoretyczne i doświadczalne połączeń z niklem ma na celu zrozumienie wiele mechanizmów reakcji zachodzących w układach biologicznych min. procesu metylacji i karbonylacji. Ma również na celu ich przyszłościowe wykorzystanie w przemyśle m. in. w produkcji kwasu octowego w procesie Monsanto [4, 5].

Obiektem badań, z zakresu teoretycznych metod w chemii wchodzących w zakres prezentowanej pracy doktorskiej, jest dwucentrowy kompleks niklu, [Fe₄S₄]-Ni_pNi_d, nazywany klasterem A. Stanowi on centrum aktywne syntazy acetylokoenzymu A (ACS), enzymu który katalizuje reakcje powstawania acetylokoenzymu A z CO, CH₃ i koenzymu A (CoASH) w bakteriach: *Moorella thermoacetica* i *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* [6–8]. Krystalografia oraz spektroskopia Mössbauera i EPR [9–12] dostarczają wielu danych eksperymentalnych dotyczących złożonej struktury i reaktywności klastera A, niewiele jest jednak prac obliczeniowych z nim związanych [13–16]. Prezentują one ponadto różne podejścia do omawianego zagadnienia. Innowacyjność niniejszej pracy przejawia się zarówno w wykonaniu obliczeń niepublikowanych do tej pory dotyczących redukcji klastera A połączonej z protonacją, ale również w zaproponowaniu mechanizmu katalitycznej metylacji enzymu ACS ,w którym istotną rolę odgrywa dwuelektronowa redukcja z przeniesieniem protonu. Zwrócono też uwagę,

że istotną rolę przy wyznaczaniu właściwości redoksowych klastrera A odgrywa ligand skoordynowany z proksymalnym atomem niklu (Ni_p). W badaniach zastosowane zostały metody chemii kwantowej oparte na teorii funkcjonałów gęstości. Wyniki otrzymano stosując metodę BS-DFT z funkcjonałem BP86 i bazą funkcyjną TZVP. Otoczenie białkowe enzymu uwzględniono stosując model ciągły rozpuszczalnika PCM [17, 18], dla czterech stałych dielektrycznych $\epsilon=4, 12, 20$ i 80. W obliczeniach sprawdzono kilka, różniących się wielkością typów modeli strukturalnych klastrera A (M0, M1, M2 i M3).

Prezentowana praca przedstawia finalne wyniki obliczeń optymalizacji geometrii klastrera A na różnych stopniach utlenienia (A_{ox} , A_{red1} i A_{red2}) oraz klastrera A z ligandami: grupą metylową, grupą karbonylową, protonem oraz anionem mrówczanowym. Przeanalizowano również ładunki i gęstości spinowe wszystkich wyselekcjonowanych struktur. Wybrano takie molekuly, których obecność sugerowana jest w strukturze krystalograficznej enzymu oraz takie, których obecność w trakcie katalizowanej przez klastrera A reakcji została potwierdzona doświadczalnie i w związku z tym, wydają się być istotne do poprawnego opisu mechanizmu reakcji. Ważny element pracy stanowiło teoretyczne wyznaczenie wartości pK_a , potencjałów redukcji oraz potencjałów redukcji sprzężonych z przyłączeniem protonu. Na ich podstawie wybrano mechanizm redukcyjnej aktywacji utlenionej formy klastrera A (A_{ox}) spośród dwóch proponowanych doświadczalnie [9, 19], a także oceniono wpływ wielkości modelu oraz otoczenia białkowego na właściwości redoksowe klastrera A.

W kolejnym etapie badań, przedstawionych w niniejszej pracy, wyznaczono ścieżkę reakcji metylacji klastrera A, przeanalizowano zmiany gęstości spinowych w trakcie reakcji oraz zaproponowano jej mechanizm. Czynnikiem metylującym w reakcji była metylokobalamina w formie "base-off". Wymieniona reakcja, jest jednym z etapów pośrednich katalizowanej przez centrum aktywne reakcji powstawania acetylokoenzymu A. Aby możliwe było poprawne opisanie mechanizmu reakcji stosowana metodyka obliczeń musi poprawnie odtwarzać potencjały redukcji reagentów, dlatego to zostało zrobione w pierwszym kroku.

Podsumowując, realizacja badań w ramach przedkładanej pracy doktorskiej miała na celu:

- (i) Wypracowanie modelu i metodyki obliczeń, która prawidłowo odtwarza doświadczalne dane strukturalne oraz potencjały redukcji i wartości pK_a dla klastrera A.
- (ii) Zaproponowanie mechanizmu redukcji utlenionej formy klastrera A (A_{ox}).
- (iii) Wskazanie mechanizmu reakcji metylacji klastrera A, będącej jednym z etapów powstawania acetylokoenzymu A.

Rozprawa została podzielona na sześć rozdziałów. W rozdziale drugim omówiono, w sposób ogólny, podstawy teoretyczne metody funkcjonałów gęstości (DFT), stosowany do obliczeń funkcyjnał BP86 oraz ciągły model rozpuszczalnika (PCM). W rozdziałach trzecim i czwartym dokonano przeglądu danych literaturowych reprezentujących obecny stan wiedzy na temat enzymu, syntazy acetylokoenzymu A (ACS) oraz jego centrum aktywnego, czyli klastera A. Informacje przedstawione w rozdziale trzecim dotyczą danych doświadczalnych: krytalograficznych i spektroskopowych, natomiast w rozdziale czwartym dokonano przeglądu literatury prac teoretycznych. Badaniom własnym został poświęcony rozdział piąty, który składa się z pięciu podrozdziałów. W rozdziale 5.1 omówiono modele klastera A stosowane w obliczeniach. Rozdział 5.2 zawiera wyniki obliczeń optymalizacji geometrii dla przedstawionych wcześniej modeli klastera A oraz analizuje ich struktury elektronowe. Rozdziały 5.3 i 5.4 dotyczą właściwości elektronowych klastera A i obejmują wyniki obliczeń wartości pK_a oraz potencjałów redukcji dla różnych stałych dielektrycznych ϵ . Rozdział 5.5 omawia wyniki obliczeń dla reakcji metylacji i przedstawia schemat proponowanego mechanizmu tej reakcji. W ostatnim rozdziale umieszczono podsumowanie i wypunktowano najważniejsze wynikające z pracy wnioski.

2 Wstęp teoretyczny

Metody opracowane w ramach teorii funkcjonałów gęstości (DFT, *ang. Density Functional Theory*) są obecnie najbardziej popularnymi i efektywnymi metodami stosowanymi w chemii układów biologicznych i katalitycznych. Implementacje tych metod znajdują się już w zdecydowanej większości pakietów programów obliczeniowych przeznaczonych do obliczeń kwantowo-chemicznych dla układów atomowych, molekularnych, krystalicznych, a także dużych układów biologicznych i nanostruktur. Umożliwiają one badanie dużych molekuł, dla których stosowanie złożonych metod chemii kwantowej jest niemożliwe ze względu na wymagania sprzętowe i wysoki koszt obliczeń. Podstawową zaletą metod DFT, jest znacznie niższy koszt obliczeniowy niż standardowo używanych metod typu *ab initio* opartych na teorii funkcji falowej (WFT, *ang. Wave Function Theory*). Równocześnie dokładność otrzymanych wyników jest, w większości przypadków porównywalna z dokładnością metod WFT opartych na przybliżeniu Hartree-Focka (HF) z uwzględnieniem dodatkowo efektów korelacji elektronowej w drugim rzędzie rachunku zaburzeń Möllera-Plesseta (MP2). Metoda DFT uwzględnia korelację elektronową i może być wykorzystywana do wyznaczania własności molekularnych związków metaloorganicznych, zawierających metale przejściowe, dla których metoda HF zawodzi ze względu na zbyt małą różnicę energii między orbitalami HOMO i LUMO.

2.1 Metoda funkcjonałów gęstości

W teorii funkcjonałów gęstości wychodzimy z przybliżenia Borna-Oppenheimera, które pozwala rozpatrywać stany elektronowe przy określonych położeniach jąder. Stan podstawowy układu można znaleźć za pomocą gęstości elektronowej zdefiniowanej w następujący sposób [20, 21]

$$\rho(\mathbf{r}) = N \sum_{\sigma_1 = \frac{1}{2}}^{-\frac{1}{2}} \int d\tau_2 d\tau_3 \dots d\tau_N |\Psi(\mathbf{r}, \sigma_1, \mathbf{r}_2, \sigma_2, \dots, \mathbf{r}_N, \sigma_N)|^2 \quad (2.1)$$

gdzie:

\mathbf{r} jest położeniem w przestrzeni trójwymiarowej, a całkowanie odbywa się po wszystkich współrzędnych spinowych \mathbf{N} elektronów i po współrzędnych przestrzennych $\mathbf{N}-1$ elektronów.

Gęstość elektronowa jest zawsze liczbą dodatnią, a jej wycałkowanie po całej przestrzeni daje nam ilość elektronów w układzie. Posiada też łatwe do przewidzenia cechy jakościowe: maksima (ostrza) w pobliżu jąder, które wraz ze wzrostem odległości od jądra dążą do zera; pochyłość ostrza określona jest przez ładunki jąder.

2.1.1 Twierdzenia Hohenberga-Kohna

Punktem wyjścia w teorii funkcjonałów gęstości, są sformułowane w 1964 roku, twierdzenia Hohenberga-Kohna [22–25]:

1. *Gęstość elektronowa stanu podstawowego $\rho_0(\mathbf{r})$ i funkcja falowa stanu podstawowego Ψ_0 mogą być używane alternatywnie jako pełne opisy właściwości stanu podstawowego.*

2. *Istnieje funkcjonal energii zależny od ρ osiągający swoje minimum dokładnie dla idealnej gęstości stanu podstawowego, czyli dla $\rho = \rho_0$.*

Spełniona jest wtedy następująca zasada wariacyjna:

$$E_v^{HK}[\rho] \geq E_0^{HK}[\rho_0] = \rho_0 \quad (2.2)$$

2.1.2 Metoda i równania Kohna-Shama

Praktyczna realizacja teorii funkcjonałów gęstości opiera się na opracowanej rok po ogłoszeniu twierdzeń metodzie Kohna-Shama [21, 23, 24]. Polega ona na zastąpieniu oddziaływań pomiędzy elektronami koncepcją wzajemnie nieoddziałujących, ale oddziałujących z jądrami i polem zewnętrznym elektronów, poruszających się w efektywnym potencjale. Dla takiego modelu funkcja falowa ma postać wyznacznika Slatera i stanowi funkcję własną efektywnego hamiltonianu będącego sumą operatorów jednoelektronowych. Zabieg ten pozwala uniknąć problemu wielu oddziałujących ze sobą ciał. Jednocześnie taki potencjał efektywny zawiera w sobie zarówno oddziaływania dwuelektronowe (korelację kulombowską) jak i korelację wymienną (statystyczną). Kluczowy jest wybór tego potencjału w taki sposób, aby gęstość nieoddziałujących elektronów dokładnie odwzorowywała gęstość rzeczywistego układu w stanie podstawowym.

Energia całkowita w metodzie DFT zależy od gęstości elektronowej i wyraża się następującym wzorem:

$$E[\rho] = T_0[\rho] + V_{ne}[\rho] + J_{ee}[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (2.3)$$

W równaniu tym kolejne człony oznaczają odpowiednio:

▷ energię kinetyczną nie oddziałujących elektronów,

$$T_0[\rho] = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \langle \phi_i | \nabla^2 | \phi_i \rangle \quad (2.4)$$

▷ energię elektrostatycznego przyciągania między jądrami atomowymi i elektronami:

$$V_{ne}[\rho] = \int v(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r} \quad (2.5)$$

▷ energię odpychania elektrostatycznego elektronów,

$$J_{ee}[\rho] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \quad (2.6)$$

▷ funkcjonał korelacyjno-wymienny,

$$E_{xc}[\rho] \quad (2.7)$$

który zawiera wszystkie składniki pominięte przez poprzednie wyrazy:

- część wymienna,
- korelacje elektronową,
- poprawkę do energii kinetycznej,
- poprawkę do oddziaływania elektronów samych ze sobą.

Dokonując wariacji wyrażenia na energię względem gęstości elektronowej, z ograniczeniami ortonormalności i nieoznaczonymi mnożnikami Lagrange'a, otrzymujemy układ równań różniczkowo-całkowych. Układ ten nazywany jest układem równań Kohna-Shama i rozwiązuje się go iteracyjnie podobnie jak w metodzie Hartree-Focka [20, 21, 25, 26].

$$\left\{ -\frac{1}{2}\nabla^2 + v + \hat{v}_{coul} + \hat{v}_{xc} \right\} \phi_i = \varepsilon_i \phi_i \quad (2.8)$$

$$\left\{ -\frac{1}{2}\nabla^2 + \hat{v}_0 \right\} \phi_i = \varepsilon_i \phi_i \quad (2.9)$$

Gdzie:

$$\hat{v}_{xc} = \frac{\delta E_{xc}}{\delta \rho} \quad (2.10)$$

Z zestawu startowych orbitali oblicza się gęstość w zerowym przybliżeniu i operator \hat{v}_0 . Rozwiązując równanie po raz kolejny otrzymuje się nowe orbitale, a procedurę powtarza się, aż do samouzgodnienia.

2.2 Stosowane funkcjonały

Dokładność i efektywność metod DFT zależy od przybliżeń i jakości funkcjonałów korelacyjno-wymiennych używanych w tych metodach. Niestety większość znanych, popularnych i standardowo stosowanych funkcjonałów korelacyjnych i wymiennych daje zadowalające wyniki tylko w pewnych obszarach obliczeń kwantowo-chemicznych, a poprawność wyników otrzymanych przy pomocy tych funkcjonałów dla innych (zbliżonych) zagadnień jest praktycznie nieprzewidywalna. Dlatego też bardzo istotny jest odpowiedni dobór funkcjonału do konkretnego problemu obliczeniowego.

Wyróżnia się cztery podstawowe grupy funkcjonałów:

1. LDA lub SDA (przybliżenie lokalnej gęstości lub spinowej lokalnej gęstości),
2. GGA (uogólnione funkcjonały gradientowe),
3. meta-GGA (funkcjonały meta-gradientowe),
4. funkcjonały hybrydowe.

W niniejszej pracy wykorzystano funkcjonał BP86, który należy do grupy funkcjonałów GGA. Powstał on przez połączenie funkcjonału wymiennego Becke (B88) [27] z funkcjonałem korelacyjnym Perdew (P86) [28].

Część wymienna funkcjonału przedstawia się wzorem ($F_x(s)$ jest współczynnikiem poprawy):

$$F_x^{B88}(s) = 1 + \frac{\beta c_2 (c_1 s)^2}{1 + 6\beta (c_1 s) \sinh^{-1}(c_1 s)} \quad (2.11)$$

$$s = \frac{x}{2(3\pi^2)^{\frac{1}{3}}} \quad (2.12)$$

gdzie:

▷ $\beta = 0.0042$ jest parametrem empirycznym dopasowanym metodą najmniejszych kwadratów do dokładnej energii wymiennej Hartree-Focka sześciu atomów gazów szlachetnych (od He do Rn);

▷ funkcja: $\sinh^{-1} y = \ln(y + \sqrt{1 + y^2})$ zapewnia prawidłowe asymptotyczne zachowanie wymiennej energii gęstości dla dużych odległości r ;

▷ parametry c_1 i c_2 wyznacza się ze wzorów: $c_1 = 2(6\pi^2)^{\frac{1}{3}}$, $c_2 = (2^{\frac{1}{3}} C_x)^{-1}$.

Cześć korelacyjna funkcjonału BP86 przedstawia się wzorem:

$$E_c^{P86}[\rho^\alpha, \rho^\beta] = E_c^{LSDA}[\rho^\alpha, \rho^\beta] + \int \frac{e^{-\Phi(\rho, \nabla\rho)}}{d(\zeta)} C_c(r_s) \frac{|\nabla\rho|^2}{\rho^{\frac{4}{3}}} d\mathbf{r} \quad (2.13)$$

Funkcja $d(\zeta)$ jest dana równaniem:

$$d(\zeta) = 2^{\frac{1}{3}} \left[\left(\frac{1+\zeta}{2} \right)^{\frac{5}{3}} + \left(\frac{1-\zeta}{2} \right)^{\frac{5}{3}} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.14)$$

oraz:

$$\Phi(\rho, \nabla\rho) = (9\pi)^{\frac{1}{6}} \tilde{f} \frac{C_c(0) |\nabla\rho|}{C_c(r_s) \rho^{\frac{7}{6}}} \quad (2.15)$$

Parametr $\tilde{f} = 0.11$ jest tak dobrany, żeby pasował do dokładnej energii korelacji atomu Ne, a $C_c(r_s)$ jest współczynnikiem w rozwinięciu gradientowym.

2.3 Model rozpuszczalnika

Standardowe obliczenia kwantowochemiczne przeprowadzane są na ogół dla układów molekularnych w próżni. Tymczasem większość interesujących reakcji (bio)chemicznych przebiega w roztworach, dlatego konieczne jest uwzględnienie oddziaływania molekuł z rozpuszczalnikiem. W obliczeniach stosuje się zaimplementowane w pakietach obliczeniowych modele rozpuszczalników. Jednym z nich jest model PCM (ang. *Polarizable Continuum Model*), w którym rozpuszczalnik traktowany jest jako ośrodek ciągły [17, 18, 29, 30]. Cząsteczka substancji rozpuszczonej umieszczana jest wewnątrz wnęki w rozpuszczalniku, zbudowanej z zachodzących na siebie sfer scentrowanych na poszczególnych atomach lub grupach atomów. Promień sfery jest proporcjonalny do promieni van der Waalsa atomów, a współczynnik proporcjonalności dobierany jest na podstawie obliczeń testowych dla wybranych układów i porównania uzyskanych danych z eksperymentem. Rozpuszczalnik w metodzie PCM jest izotropowym medium ciągłym o stałej wartości przenikalności dielektrycznej ϵ . W środku wnęki stała dielektryczna $\epsilon=1$, natomiast na zewnątrz ma wartość charakterystyczną dla danego rozpuszczalnika.

W modelu PCM proces solwatacji dzieli się na trzy etapy:

1. utworzenie wnęki w rozpuszczalniku,
2. umieszczenie we wnęcie cząsteczki substancji rozpuszczonej,
3. wygenerowanie rozkładu ładunków.

Wyznacza się energię swobodną solwatacji, która jest sumą trzech członów:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{cav} + \Delta G_{vdW} + \Delta G_{el} \quad (2.16)$$

- ▷ ΔG_{cav} - energii kawitacji, wyznaczonej jako ważony udział wkładu od izolowanego atomu;
- ▷ ΔG_{vdW} - energii van der Waalsa, wyznaczonej z sumy wkładów atomowych;
- ▷ ΔG_{el} - energii elektrostatycznej - przy obliczaniu jej wkładu zakłada się, że rozpuszczalnik stanowi ciągły polaryzowalny ośrodek odpowiadający na rozkład ładunku cząsteczki rozpuszczonej.

2.4 Potencjały redukcji i pK_a

Możliwość teoretycznego wyznaczenia wartości stałej równowagi reakcji dysocjacji kwasów w wodzie, K_a lub jej ujemnego logarytmu: ($pK_a = -\log K_a$) przy użyciu spójnego, dobrze zdefiniowanego podejścia bez stosowania zewnętrznych przybliżeń lub dopasowywania wyników do danych doświadczalnych ma dla chemików ogromne znaczenie [30, 31]. Główna trudność w obliczaniu absolutnych (pK_a) i względnych wartości (pK'_a) polega na wyznaczeniu zmiany entalpii swobodnej związanej z deprotonacją. Obliczenie dokładnych wartości pK_a jest bardzo wymagające, ponieważ błąd w wyniku $\Delta G^0 = 1.36$ kcal/mol warunkuje błąd rzędu 1 jednostki pK_a [31–33].

pK_a związane jest z entalpią swobodną następującą zależnością:

$$pK_a = -\log K_a = \frac{\Delta G_{aq}^0}{2.303RT} \quad (2.17)$$

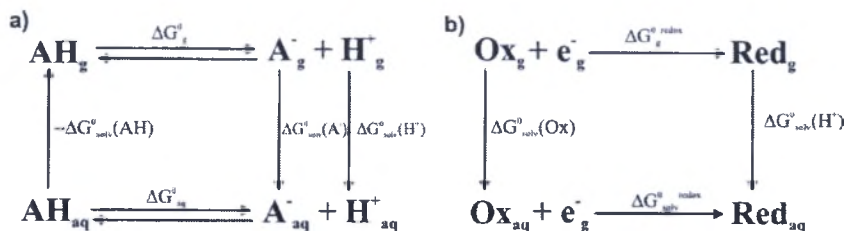
gdzie: $R = 1.987 \cdot 10^{-3}$ kcal/(K·mol) jest stałą gazową, $T = 298.15$ K, ΔG_{aq}^0 oznacza swobodną entalpię dla reakcji deprotonowania w roztworze, a czynnik 2.303 pochodzi z zamiany logarytmu naturalnego na dziesiętny. Rysunek 2.1a obrazuje cykl Borna-Habera, na podstawie którego wyznacza się ΔG_{aq}^0 zgodnie ze wzorem:

$$\Delta G_{aq}^0 = \Delta G_g^0 + \Delta G_{solv}^0(H^+) + \Delta G_{solv}^0(A^-) - \Delta G_{solv}^0(AH) \quad (2.18)$$

gdzie:

$$\Delta G_g^0 = \Delta G_g^0(A^-) + \Delta G_g^0(H^+) - \Delta G_g^0(AH) \quad (2.19)$$

Należy mieć na uwadze, że dla każdego z indywiduów należy uwzględnić wkład pochodzący od zmiany stanu standardowego z 1 atmosfery w temperaturze 298.15 K w fazie gazowej na 1 mol/dm³ w fazie skondensowanej. Dużą trudność sprawia wyznaczenie teoretycznej wartości $\Delta G_{solv}^0(H^+)$, a dostępne dane literaturowe podają istotne różnice w wartościach [33, 34]. Problem sprawia także obliczenie entalpii swobodnej protonu w fazie gazowej, $G_g(H^+)$. Swobodną entalpię reakcji w fazie gazowej wyznacza się dla izolowanych cząsteczek za pomocą obliczeń kwantowo-chemicznych, natomiast swobodną entalpię solwatacji z zastosowaniem wybranego modelu rozpuszczalnikowego.



Rysunek 2.1: Cykl termodynamiczny Borna-Habera a) stosowany do wyznaczania stałej równowagi reakcji b) stosowany do wyznaczania potencjału redukcji. Odnośnik [30]

Podobnie wyznacza się potencjały redukcji, a analogiczny cykl Borna-Habera dla procesu jednoelektronowego przedstawiono na Rysunku 2.1b [31, 32]. Całkowita, swobodna entalpia Gibbsa jest sumą wartości w poszczególnych etapach:

$$\Delta G_{\text{sol}}^{0, \text{redox}} = \Delta G_g^{0, \text{redox}} + \Delta G_{\text{sol}}^0(\text{Red}) - \Delta G_{\text{sol}}^0(\text{Ox}) \quad (2.20)$$

Energia swobodna solwatacji elektronu jest równa zero, a żeby odnieść wyniki obliczone do pomiarów eksperymentalnych względem standardowej elektrody wodorowej należy uwzględnić, że $\Delta \text{SHE} = 4.28 \text{ V}$ zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi [35–37].

Dla znanych entalpii swobodnych badanego procesu potencjał redukcji wyznacza się z równania Nernsta:

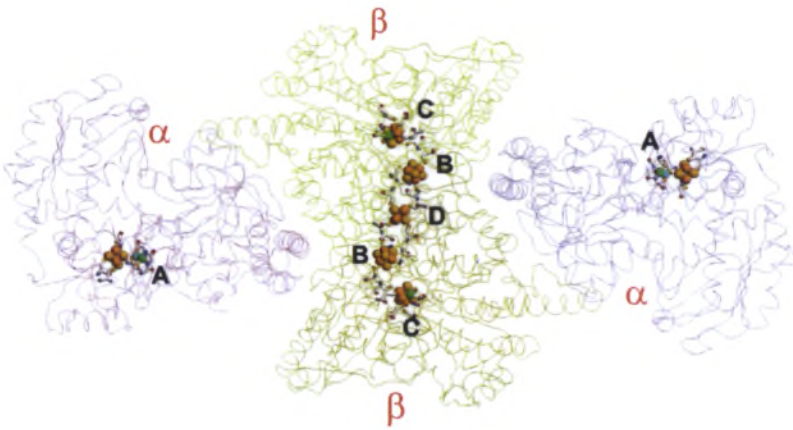
$$E^0 = -\frac{\Delta G_{\text{sol}}^{0, \text{redox}}}{nF} \quad (2.21)$$

gdzie: n jest liczbą elektronów biorących udział w reakcji redoks, a $F = 23.06 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{V})$ jest stałą Faradaya.

Reakcje redoks mogą być połączone z innymi procesami. Przykładowo może to być zmiana konformacji cząsteczki lub przyłączenie liganda. Wielu przykładów złożonych procesów redoks dostarcza biochemia. Skomplikowane procesy przemiany materii, zachodzące w komórkach organizmów żywych min. w łańcuchu oddechowym, polegają na transporcie elektronów od związków "bardziej zredukowanych" do "bardziej utlenionych". W tych wieloetapowych szlakach transportu elektronów, od donorów do akceptorów, istotną rolę odgrywają proste reakcje utleniania i redukcji jonów [38–40].

3 Syntaza acetylokoenzymu A

Nikiel (Ni, *łac. niccolum*) jest pierwiastkiem chemicznym z grupy metali przejściowych, który odgrywa ważną rolę w biologii roślin oraz beztlenowych bakterii i archeonów [41, 42]. Jest on obecny w centrach reaktywności enzymów katalizujących wiele reakcji biochemicznych tych organizmów. U roślin wchodzi w skład ureazy, enzymu który uczestniczy w rozkładzie mocznika. Siedem z ośmiu metaloenzymów niklu katalizuje reakcje w których produkowane lub przetwarzane są następujące gazy: CO, CO₂, CH₄, H₂, NH₃ i O₂ [1–3]. Ich poznanie jest ważne dla zrozumienia procesu powstawania życia na Ziemi, utrzymania równowagi ekologicznej oraz ze względu na potencjalne zastosowanie w przemyśle [4].



Rysunek 3.2: Struktura CODH/ACS z uwzględnieniem poszczególnych podjednostek (*Moorella thermoacetica*, PDB - 1OAO). Odnośnik [43]

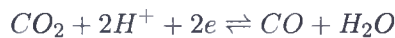
Acetylokoenzym A (CH₃CO-CoASH) dla aerobiontów jest kluczowym półproduktem cyklu Krebsa [44], natomiast u anaerobiontów takich jak jednokomórkowe, beztlenowe bakterie acetogeniczne i metanogeniczne oraz archebakterie

używany jest w procesie redukcji atmosferycznego CO₂ w celu uzyskania węgla do produkcji biomasy. Proces ten odbywa się w redukcyjnym cyklu acetylokoenzymu A, określanym jako szlak Wood-Ljungdahl'a [6, 8, 45, 46]. W przeciwieństwie do odwrotnego cyklu Krebsa i cyklu Calvina, proces ten nie jest cykliczny. Redukcyjny szlak acetylokoenzymu A jest metodą wytwarzania związków organicznych polegającą na redukcji CO₂ przez kilka związków pośrednich do acetylokoenzymu A. Kluczowa reakcja redukcji CO₂ do CO przeprowadzana jest przez dehydrogenazę, której kofaktorami są Ni, Zn, Fe. Donorem elektronów w tej reakcji jest wodór. Do CO połączonego z dehydrogenazą przyłączana jest grupa metylova przenoszona przez białko korynoidowe o podobnej budowie jak witamina B12. Białko to pobiera grupy metylowe z tetrahydrometanopteryny i przyłącza do związanego z enzymem CO. Powstała w reakcji grupa acetylowa przenoszona jest na koenzym A co prowadzi do powstania acetylokoenzymu A.

Kluczowym enzymem wykorzystywanym w opisanym wyżej procesie przez bakterię *Moorella thermoacetica* jest syntaza acetylo-CoA/dehydrogenaza tlenku węgla (II) (ACS/CODH) [45, 47, 48]. Ten dwufunkcyjny, heterotetrameryczny enzym posiada masę 301 kDa i składa się z dwóch rodzajów podjednostek (Rysunek 3.2) [5, 8]. Centralnie w środku występują podjednostki β odpowiedzialne za aktywność CODH i zawierające klaster: *B, C, D*. Natomiast symetrycznie po bokach znajdują się podjednostki α odpowiedzialne za aktywność ACS i zawierające badany klaster *A*. W strukturze enzymu pomiędzy klasterem *C* i klasterem *A* występuje hydrofobowy tunel (długości około 138 Å), którym transportowany jest CO w trakcie katalizy [49]. Tunel dostarcza CO i CO₂ do miejsc aktywnych, a dostępność tych gazów jest regulowana przez zmiany konformacji białka (Rysunek 3.3).

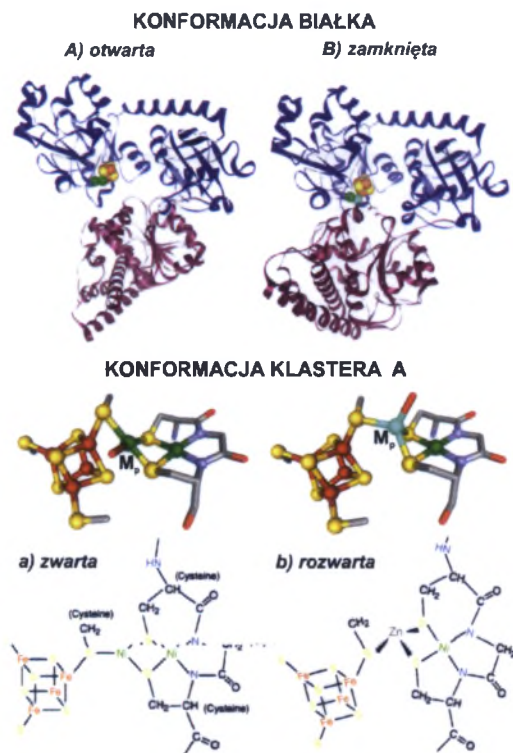
ACS/CODH katalizuje dwa ważne biologicznie procesy [6–8]

1. Odwrotną redukcję atmosferycznego CO₂ do CO. Odpowiedzialny jest za nią klaster *C* [Fe₄S₄Ni] należący do CODH.



2. Syntezę acetylokoenzymu A przy udziale CO, koenzymu A (CoASH) i CH₃ przenoszonego przez białko koryna-żelazo-siarkowe (CoFeSP). Ma ona miejsce w klastrze *A* [Fe₄S₄]Ni₂ należącym do ACS.





Rysunek 3.3: Wzajemna orientacja białka i klastera A w zależności od metalu skoordynowanego w miejscu M_p ($M_p = \text{Ni}, \text{Cu}, \text{Zn}$). Konformacja białka: A) otwarta B) zamknięta. Konformacje klastera A: a) zwarta b) rozwarta. Odnośnik [50,51]

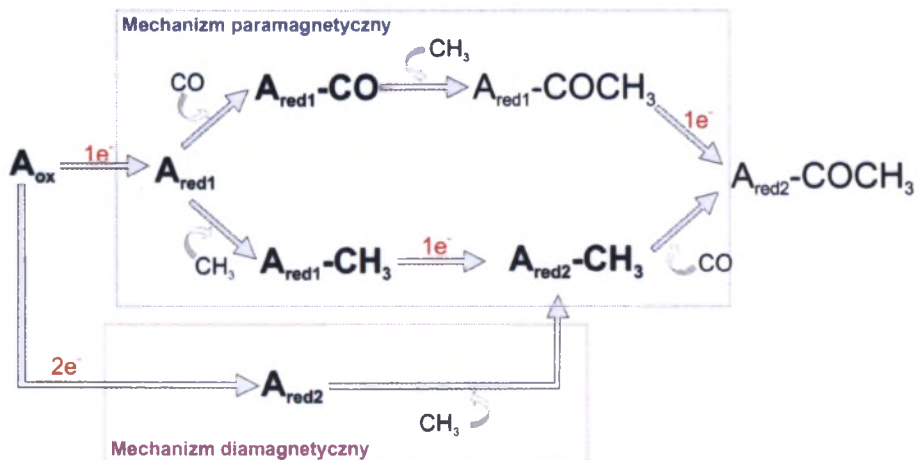
Wciąż trwają prace nad dokładnym poznaniem enzymu ze względu na rolę jaką może on pełnić w utrzymaniu równowagi ekologicznej przez wiązanie gazów cieplarnianych (*reakcja 1*) oraz z uwagi na jego potencjalne znaczenie technologiczne przy produkcji kwasu octowego (proces Monsanto) i w procesie Reppe'a (*reakcja 2*) [4, 5].

Klaster A, stanowiący centrum aktywne ACS, jest dwucentrowym kompleksem niklu połączony z kubenem żelazo-siarkowym: $[\text{Fe}_4\text{S}_4]\text{-Ni}_p\text{Ni}_d$, gdzie Ni_p i Ni_d oznaczają odpowiednio proksymalne i dystalne położenie niklu w stosunku do kubanu. [52, 53]. Enzym ACS może przyjmować dwie konformacje: otwartą i zamkniętą, które odpowiadają dwóm konformacjom klastera A: zwartej i rozwartej (Rysunek 3.3). Warunkują one aktywność katalityczną enzymu. W strukturze otwartej enzym wykazuje pełną aktywność katalityczną, a jodem w pozycji proksymalnej jest Ni o koordynacji planarnej. W strukturze zamkniętej enzym jest nieaktywny, a proksymalny atom niklu jest zastąpiony przez Cu lub Zn

w koordynacji tetraedrycznej. W pracy [54] zasugerowano, że miedź i cynk mogą zostać wprowadzone w strukturę klastra podczas oczyszczania białka lub w procesie krystalizacji. W artykule [55, 56] udowodniono, że atom Ni_p jest labilny i można go wyodrębnić z klastra przez ligandy chelatujące, takie jak fenantrolina.

Klaster A syntazy acetylokoenzymu A może występować na trzech stopniach utlenienia:

- w formie utlenionej o konfiguracji elektronowej $[Fe_4S_4]^{2+}-Ni_p^{2+}Ni_d^{2+}$ ($S=0$) - oznaczany jako A_{ox} ,
- w formie jednoelektronowo zredukowanej o konfiguracji elektronowej $[Fe_4S_4]^{2+}-Ni_p^{1+}Ni_d^{2+}$ ($S=\frac{1}{2}$) - oznaczany jako A_{red1} ,
- w formie dwuelektronowo zredukowanej o konfiguracji elektronowej $[Fe_4S_4]^{1+}-Ni_p^{1+}Ni_d^{2+}$ ($S=0$) - oznaczany jako A_{red2} , występuje tu sprzężenie antyferromagnetyczne [7, 19, 57]



Rysunek 3.4: Proponowane mechanizmy reakcji katalitycznej klastra A: a) paramagnetyczny b) diamagnetyczny. Źródło [58, 59]

Redukcja w obecności CO daje tzw. strukturę $A_{red}-CO$ ($NiFeC$) $[Fe_4S_4]^{2+}Ni_p^{1+}(CO)Ni_d^{2+}$ ($S=\frac{1}{2}$) zidentyfikowaną dzięki spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) [9–11, 60–62]. Metylowany klaster A posiada strukturę elektronową $[Fe_4S_4]^{2+}Ni_p^{2+}(CH_3)Ni_d^{2+}$ i stan spinowy ($S=0$) [7]. Eksperymentalnie stwierdzono, że reakcja metylacji utlenionej formy klastra A (A_{ox}) przez metylokobalaminę lub białko CoFeSP zachodzi

w obecności czynników redukujących o niskim potencjale redukcji (niższym niż -0.5 V) i zależy od pH [9, 19]. Związek potencjałów redukcji z pH wskazuje, że w strukturach zredukowanych do klastra A przyłączany jest proton [9, 12, 19, 63].

Mechanizm reakcji katalitycznej klastra A w enzymie ACS nie jest w pełni poznany [12, 19, 63–65]. Lindhal i współpracownicy [7, 65, 66] zaproponowali mechanizm diamagnetyczny (Rysunek 3.4), w którym aktywacja klastra A wiąże się z dwuelektronową redukcją. Grupa metylowa jest przenoszona z białka $\text{CH}_3\text{-CoFeSP}$ na klaster A jako kation, a następnie przyłącza się CO i tworzona jest grupa acetylowa. Koenzym A reaguje z acetylem tworząc acetylokoenzym A, a zredukowany klaster A zostaje odtworzony. Zgodnie z tym mechanizmem $\text{A}_{red1}\text{-CO}$ nie jest produktem przejściowym reakcji.

Ragsdale i współpracownicy [59, 64] zaproponowali tzw. przypadkowy mechanizm paramagnetyczny (Rysunek 3.4). CO i CH_3 reagują z jednoelektronowo zredukowanym klastrzem A, przy czym kolejność ich przyłączania do Ni_p jest przypadkowa, a do redukcji i utworzenia $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}\text{Ni}_p^{3+}(\text{CH}_3)\text{Ni}_d^{2+}$ dochodzi w trakcie metylacji. Następnie powstaje acetyl który łączy się z koenzymem A.

4 Dotychczasowy stan badań teoretycznych

Przy zastosowaniu metod kwantowochemicznych, zwłaszcza dla dużych molekuł, obliczenia wykonuje się nie dla rzeczywistej struktury, ale dla wydzielonego fragmentu rzeczywistego układu molekularnego tzw. struktury modelowej. Ważne jest, by struktura ta zachowywała istotne własności układu rzeczywistego z punktu widzenia rozwiązywanego na drodze obliczeniowej problemu. Geometria, struktura elektronowa i reaktywność klastra A syntazy acetylokoenzymu A, dla różnych struktur modelowych, była przedmiotem badań czterech prac teoretycznych [13–16].

Pierwsza ukazała się w 2003 roku. Schenker i Brunold [14] wykonali obliczenia struktury elektronowej i geometrycznej dla dwóch modeli NiFeC, różniących się atomem metalu w miejscu M_p . Pierwsza struktura zawierała Cu^+ , natomiast druga Ni^+ . Autorzy pokazali, że właściwości klastra A zgadzają się z doświadczalnymi stałymi sprzężenia nadsubtelnego jeżeli metalem w pozycji proksymalnej jest nikiel oraz wskazali, że A_{red2} posiada strukturę elektronową $[Fe_4S_4]^{1+}Ni_p^{1+}Ni_d^{2+}$ i charakteryzuje się sprzężeniem antyferromagnetycznym między kubanem i Ni_p .

Autorzy drugiej publikacji, Webster i współpracownicy [15] wykonali w 2004 roku obliczenia optymalizacji geometrii stanów przejściowych i produktów pośrednich w cyklu katalitycznym enzymu. Ich celem było sprawdzenie czy w miejscu M_p znajduje się nikiel czy miedź, oraz który z tych metali silniej wiąże się z CO i CH_3 . Przetestowali też, czy aktywacja enzymatyczna klastra wymaga jedno- czy dwu- elektronowej redukcji. Przyjęty model strukturalny pozbawiony był kubanu żelazo-siarkowego, który zastąpiono grupą $Fe(SH_3)^{2+}$. Obliczenia programem Gaussian98 wykonano metodą DFT/B3LYP, przypisując różne bazy funkcyjne poszczególnym atomom klastra (Ni, Fe, Cu, S - baza LANL2DZ z efektywnym potencjałem ECP; N, C, O - baza cc-pVDZ; H- baza D95V).

Najbardziej obszerna z prac obliczeniowych ukazała się w 2005 roku i należy do Amara oraz współpracowników [13]. Dla wszystkich obliczeń kwantowochemicznych przyjęto dwa modele strukturalne centrum aktywnego, a atomy były zamrażane w trakcie optymalizacji geometrii. W modelu podstawowym, w miejsce

aminokwasów (cystein i glicyny) zostały dodane atomy wodoru. W drugim rozważanym modelu (o konformacji rozwartej), uwzględniono wiązania wodorowe tworzące się z aminokwasami białka. Modelowano domniemane stany pośrednie, z grupą karbonylową (A_{red1} -CO, NiFeC), metylową (A_{red2} -CH₃) i acetylową, pojawiające się w diamagnetycznym cyklu katalitycznym postulowanym przez Lindahl'a [43]. W obliczeniach, przeprowadzonych za pomocą programu Jaguar, zastosowano metodę DFT z funkcjonałem B3LYP w bazie funkcyjnej LACVP. Większą bazą funkcyjną LACV3P dla atomów metali, oraz bazą cc-pVTZ(-F) dla pozostałych atomów posłużono się do obliczeń *single point* dla struktur zoptymalizowanych. Obliczenia zaprezentowane w pracy potwierdziły konfigurację elektronową $[Fe_4S_4]^{1+}Ni_p^{1+}Ni_d^{2+}$ i antyferromagnetyczne sprzężenie w A_{red2} . Wskazano, że mało prawdopodobne jest aby atom $Ni_p(0)$ był związany z kubanem o konfiguracji $[Fe_4S_4]^{2+}$, natomiast może wiązać się z $[Fe_4S_4]^{1+}$. Pokazano, że dystalny atom niklu (Ni_d) nie uczestniczy w procesie katalizy i zasugerowano, że utworzenie mostka disiarczkowego może dostarczyć dwóch elektronów potrzebnych w trakcie reakcji metylacji.

Ostatnia z prac obliczeniowych została opublikowana w kwietniu bieżącego roku [16]. Dwie rozważane struktury modelowe klastrera A, mała i duża uwzględniająca białko, zawierają histydynę zamiast pomostowej cysteiny 512 (Rysunek 5.5). Głównym celem autorów publikacji było sprawdzenie wpływu tej zmiany na parametry geometryczne i właściwości elektronowe klastrera A. W obliczeniach wykorzystano metodę BS-DFT i przetestowano dwa funkcjonały BP86 oraz B3LYP.

5 Obliczenia własne

Przedstawione w pracy obliczenia wykonano przy pomocy programu Gaussian09 [67]. Wyniki otrzymano stosując metodę DFT z funkcjonalem BP86 [27, 28] w bazie TZVP [68]. W obliczeniach zastosowano funkcje o złamanej symetrii (ang. *Broken Symmetry*, BS) [69, 70], a do wyznaczenia dwuelektronowych całek kolumbowskiich korzystano z dopasowania gęstości (ang. *Density Fitting Approximation*) wraz z odpowiadającą bazą TZVPfit [68]. Wpływ otoczenia białkowego, na energię i geometrię uzyskanych struktur, uwzględniono stosując model ciągły rozpuszczalnika PCM [17, 18] ze stałą dielektryczną $\epsilon=4, 12, 20$ i 80 . Do modelowania środowiska białkowego powszechnie stosuje się stałą dielektryczną $\epsilon=4$ [29], jednak wykazano, że wyższa wartość ϵ pozwala uzyskać lepszą zgodność z doświadczeniem dla wartości pK_a i odległości metal–metal [71, 72]. Potwierdziły to także wyniki naszych początkowych testowych obliczeń. Analiza populacyjna Mullikena silnie zależy od wyboru bazy funkcyjnej, dlatego ładunki atomowe wyznaczono stosując analizę naturalnych orbitali wiązań, znaną jako metoda NBO (ang. *Natural Bond Orbital*) [73, 74].

W celu wyznaczenia wartości pK_a oraz potencjałów redukcji zastosowano w pracy metodologię Noodleman'a i współpracowników [71, 75–77]. Wykonywali oni podobne obliczenia dla białka Rieske oraz reduktazy rybonukleotydowej.

Wartości pK_a zostały obliczone ze wzoru:

$$pK_a = [E(M)_{sol} - E(MH^+)_{sol} + \Delta G_{sol}(H^+, 1 atm) - T\Delta S_{gas}(H^+) + \frac{5}{2}RT + \Delta ZPE]/1.37 \quad (5.22)$$

W powyższym wzorze $\Delta G_{sol}(H^+, 1 atm)$ jest energią solwatacji protonu pod ciśnieniem 1 atmosfery gazowego wodoru, która z danych eksperymentalnych wynosi -263.98 kcal/mol [36, 37, 78]. Wkład entropii ruchu translacyjnego do energii swobodnej protonu w fazie gazowej $T\Delta S_{gas}(H^+)$ w temperaturze 298 K oraz pod ciśnieniem $1 atm$ wynosi -7.76 kcal/mol. Fragment wzoru $\frac{5}{2}RT$ uwzględnia wkład energii ruchu translacyjnego protonu $\left(\frac{3}{2}RT\right)$ oraz $PV = RT$

[79]. Energia punktu zerowego (ΔZPE) dla struktur protonowanych została obliczona dla małych modeli [80], w których nie było ograniczeń geometrii. Struktury małych modeli i wartości ΔZPE znajdują się w Załącznikach (Tablica C1, Rysunek C1).

Potencjał redukcji został obliczony według wzoru:

$$E_0 = [E(M^+)_{sol} - E(M)_{sol}]/n + \Delta SHE, \quad (5.23)$$

gdzie: potencjał standardowej elektrody wodorowej $\Delta SHE=4.28$ V został zaczerpnięty z danych literaturowych [35–37], a $n=1$ lub 2 oznacza liczbę elektronów biorących udział w procesie redukcji.

Potencjał redukcji związany z przyłączeniem protonu wyznaczono z równania:

$$E'_0 = E_0 + \frac{1.37 m}{23.06 n} (pK_a - pH), \quad (5.24)$$

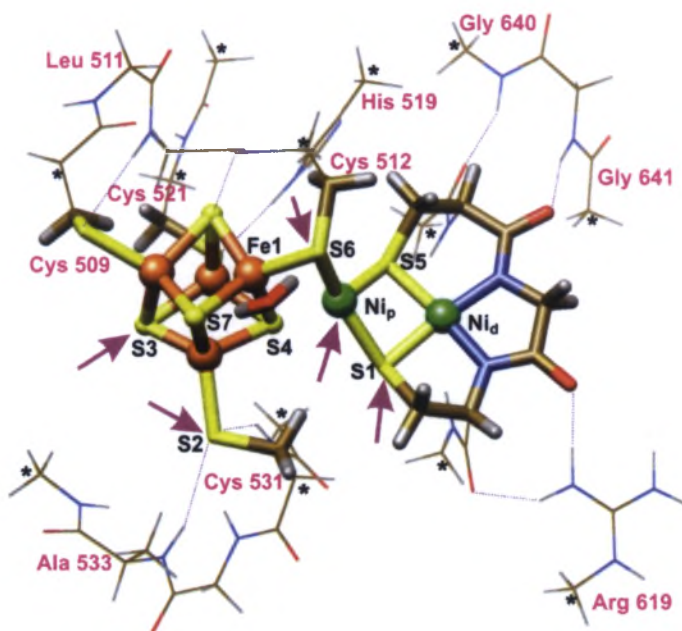
gdzie: m oznacza liczbę protonów biorących udział w reakcji redukcji (w niniejszej pracy $m=1$).

5.1 Modele obliczeniowe

Dla klastera A syntazy acetylokoenzymu A dysponujemy geometrią doświadczalną. Współrzędne startowe do obliczeń zostały wygenerowane ze struktury krystalograficznej, opisanej dla bakterii *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*, która jest dostępna w międzynarodowej bazie Protein Data Bank jako 1RU3 [51]. Wybrane, wyznaczone metodami eksperymentalnymi parametry geometryczne klastera A znajdują się w Tablicy 5.1. Zastosowana w obliczeniach struktura modelowa klastera A została pokazana na Rysunku 5.5. Numeracja atomów stosowana w tekście i tablicach jest zgodna z tym rysunkiem. Na ilustracji za pomocą gwiazdek oznaczono atomy zamrożone w trakcie optymalizacji geometrii, strzałkami pokazano rozważane miejsca protonacji, natomiast liniami przerywanymi wyróżniono wiązania wodorowe, które tworzą się między atomami siarki i tlenu klastera A, a aminokwasami białka. Wszystkie, różniące się wielkością, wykorzystane do obliczeń modele strukturalne klastera A zostały pokazane na Rysunku 5.6 i oznaczono je odpowiednio, od najmniejszego do największego, jako M0, M1, M2 i M3.

W małym modelu M0 cząsteczki cystein: Cys509, Cys512, Cys521 i Cys531 zastały zastąpione grupami $-SCH_3$, natomiast aminokwasy Ser597 i Phe601 przez atomy H. Jedynie dla tego modelu nie zamrażano atomów w trakcie przeprowadzania obliczeń optymalizacji geometrii. W modelu średnim M1 cząsteczki cystein: Cys509, Cys512, Cys521 i Cys531 modelowane były przez grupy $-SCH_2CH_3$, natomiast aminokwasy Ser597 i Phe601 przez grupy $-COCH_3$

i $-\text{NHCH}_3$. W modelach dużych, M2 i M3, zostały uwzględnione reszty aminokwasowe, które mogą tworzyć wiązania wodorowe z atomami siarki reszt tiolowych kubanu i atomami tlenu w koordynacyjnym otoczeniu niklu. W modelu M2 włączono w strukturę tylko aminokwasy w obrębie kubanu żelazo-siarkowego, a w modelu M3 dodano argininę (Arg 619) celem zbadania jak duży wpływ na potencjały redukcji ma ten zasadowy aminokwas występujący w białku po stronie atomów niklu.



Rysunek 5.5: Zastosowana w obliczeniach struktura modelowa klastra A oparta na strukturze krystalograficznej 1RU3, PDB. Odnośnik [51]

- ◇ Gwiazdki oznaczają atomy zamrożone w trakcie optymalizacji,
- ◇ Strzałki pokazują rozważane miejsca protonacji,
- ◇ Linie przerywane wskazują wiązania wodorowe,
- ◇ Numeracja atomów stosowana w tekście i tablicach jest zgodna z tym rysunkiem

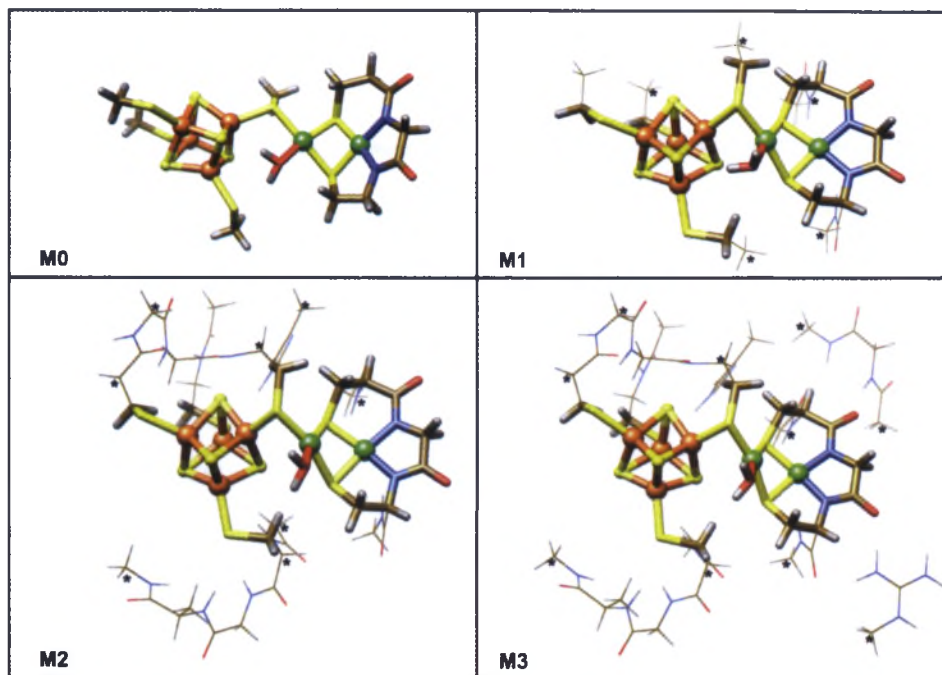
Dla wskazanych modeli strukturalnych przeprowadzono optymalizację geometrii klastra A na trzech stopniach utlenienia: A_{ox} , A_{red1} i A_{red2} . Uwzględniono również struktury protonowane klastra A oraz z ligandami ważnymi w cyklu katalitycznym enzymu. Ponadto dla wszystkich rozpatrywanych modeli, stosując analizę naturalnych orbitali wiązań (NBO) wyznaczono gęstości spinowe i ładunki, a według wzorów przytoczonych w poprzednim podrozdziale obliczono wartości pK_a i potencjały redukcji. Wszystkie otrzymane wyniki porów-

nano z dostępnymi danymi literaturowymi [9,19,43,51,81]. Pozwoliło to na ocenę wpływu wielkości modelu oraz otoczenia białkowego na właściwości redoksowe klastra A.

Tablica 5.1: Wybrane, wyznaczone eksperymentalnie parametry geometryczne klastra A

$M_p =$ $r[\text{Å}]$	DANE KRYSZTALOGRAFICZNE															
	Ni ^{a)}	Cu ^{b)}	Zn ^{c)}	Ni ^{c)}	Cu ^{g)}	Cu ^{h)}										
M_p -Ni _d	2.980	2.766	2.820	2.806	2.776	2.833	3.041	3.120	3.116	3.045	3.012	2.693	2.896	2.969	2.875	
M_p -Fe1	2.680	3.471	3.258	3.324	3.545	3.746	2.662	2.895	3.031	2.851	2.877	4.913	2.978	3.010	2.997	
kąty walencyjne [°]																
S6-M _p -S5	107.4	114.6	120.4	119.4	112.2	106.8	105.8	124.5	111.7	126.3	125.5	66.3	130.1	123.2	124.4	
S6-M _p -S1	174.3	131.1	141.3	138.8	127.9	121.2	164.0	149.0	148.8	145.5	145.2	65.8	154.7	144.5	144.7	
S1-M _p -S5	76.4	82.3	85.2	82.8	84.7	81.6	86.6	86.4	99.3	87.4	87.4	69.9	75.2	88.4	90.2	
Ni _p -H ₂ O	2.7															
Fe1-S6-Ni _p	70.9	102.4	93.6	96.0	103.2	107.9	69.8									
kąty dwuścienny [°]																
Ni _p -S2-Ni _d	125.0	114.3	121.4	117.9	118.3	114.0	138.0									
EXAFS																
$M_p =$ $r[\text{Å}]$	Ni ^{a)}	Cu ^{d)}	Ni ^{e)}	Cu ^{f)}												
M_p -Ni _d	2.89	2.78	2.97	2.646												
M_p -Fe1	2.71	2.96														
Ni _p -H ₂ O	2.32		2.80													

a) Odnosnik [51], b) Odnosnik [82], c) Odnosnik [43], d) Odnosnik [64], e) Odnosnik [81], f) Odnosnik [83], g) Odnosnik [84], h) Odnosnik [49]



Rysunek 5.6: Modele klastera A stosowane w obliczeniach

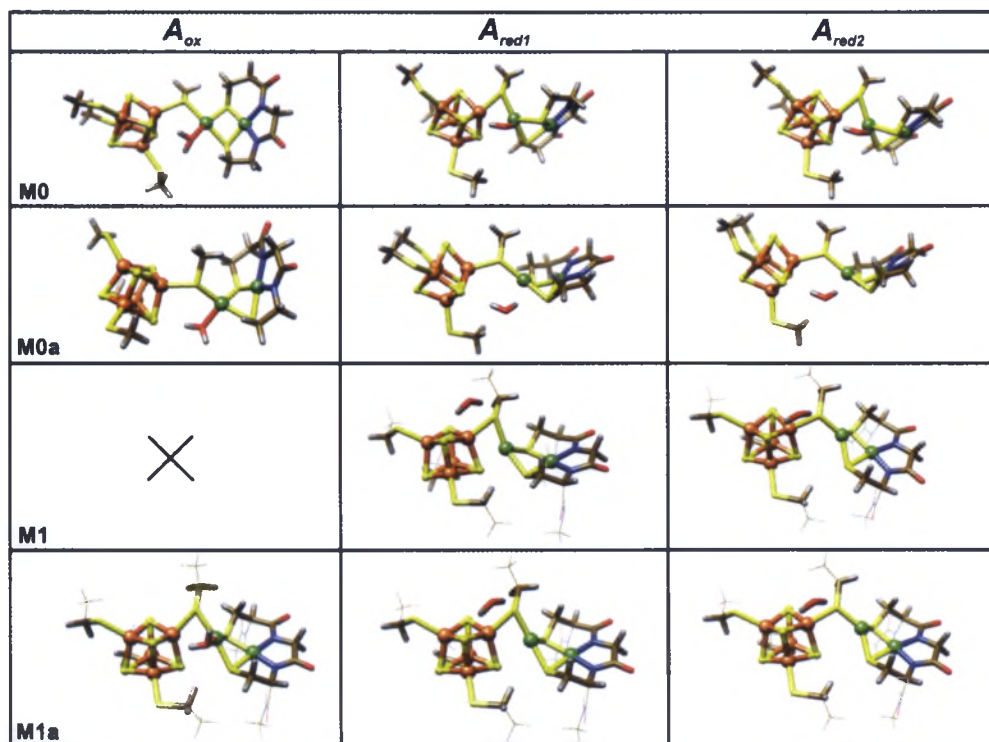
5.2 Geometria i struktura elektronowa klastera A

5.2.1 Klaster A

Pierwszym etapem pracy było przeprowadzenie obliczeń optymalizacji geometrii klastera A na różnych stopniach utlenienia: A_{ox} , A_{red1} i A_{red2} . W strukturze krystalograficznej 1RU3 [50] z proksymalnym atomem niklu skoordynowana jest cząsteczka H_2O , dlatego jest ona obecna we wszystkich strukturach w trakcie optymalizacji. Na Rysunkach 5.7 i 5.8 przedstawiono zoptymalizowane geometrie klastera A na różnych stopniach utlenienia dla modeli M0, M1, M2 i M3 otrzymane dla $\epsilon=20$. W Tabelicy 5.2 zamieszczone są wartości energii zoptymalizowanych struktur, natomiast wybrane zoptymalizowane odległości między atomami znajdują się w Tabelicy 5.3. Dla $\epsilon=4$, dla małego modelu M0 uzyskano zbyt ujemne wartości potencjałów redukcji, z tego względu zrezygnowano z tej stałej dielektrycznej w obliczeniach dla dużych modeli (M2 i M3).

Model mały (M0) i średni (M1) są konstrukcyjnie giętkie. W wyniku obliczeń otrzymano dla nich dwie struktury charakteryzujące się odpowiednio krótką (konformacja zwarta) i długą (konformacja rozwarta) odległością Ni_p-Fe1 , przy

czym energia struktury zwartej jest zawsze o około 0.01-0.02 a.u. niższa. Ponieważ jednoelektronowo zredukowany model M1 nie występuje w formie rozwartej, wykonano dodatkowe obliczenia w których odległość Ni_p -S4 została ustalona na 2.9 Å, podobnie do wartości podawanej dla kryształu [50]. Przyczyną takiego postępowania jest brak zwartej struktury w dostępnych danych doświadczalnych. Zgodnie z przeprowadzonymi obliczeniami w przypadku modeli M2 i M3, dla których uwzględniono dalsze otoczenie białkowe, otrzymano jedynie konformację zwartą, o krótkiej odległości Ni_p -Fe1. Obecność aminokwasów nie pozwala bowiem na obliczenia z zamrożoną odległością Ni_p -Fe1.

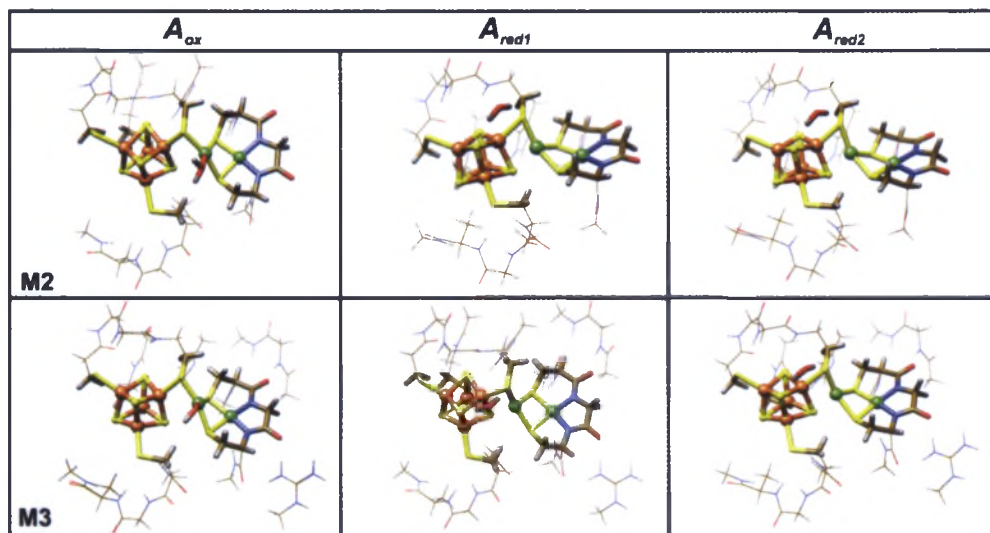


Rysunek 5.7: Zoptymalizowane geometrie klastra A na różnych stopniach utlenienia dla modeli M0 i M1. Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=20$. Otrzymano dwie konformacje klastra A: zwartą i rozwartą. Literą *a* w nazwie modelu oznaczono struktury o konformacji rozwartej. Obliczenia dla formy utlenionej (A_{ox}) modelu M1 nie były wykonywane

Dla wszystkich struktur utlenionych (A_{ox}) można zaobserwować, że podobnie jak w strukturze krystalograficznej cząsteczka wody związana jest przez atom tlenu z atomem Ni_p (Rysunek 5.7, Rysunek 5.8, Tablica 5.3). Po redukcji klastra cząsteczka wody odłącza się od metalu i wiąże wiązaniami wodorowymi przez

atomy siarki. Dla modeli M1, M2 i M3 zamrożone w trakcie obliczeń optymalizacji geometrii atomy węgla (Rysunek 5.7 i 5.8) nie pozwalają na rotacje kubanu oraz zapobiegają innym przemieszczeniom atomów, które nie są możliwe w białku.

Biorąc pod uwagę dane zawarte Tablicy 5.3 można zaobserwować kilka ogólnych zależności. Dla struktur utlenionych (A_{ox}) wszystkich branych pod uwagę modeli odległość Ni_p-Ni_d jest mniejsza, a Ni_p-Fe1 większa niż dla struktur zredukowanych, co wynika z koordynacji cząsteczki wody do Ni_p . W strukturach jedno- i dwu-elektronowo zredukowanych (A_{red1} i A_{red2}) dla modeli M1, M2 i M3 odległość między atomami Ni_p-Ni_d jest duża i przekracza 3.0 Å, natomiast odległość Ni_p-Fe1 jest mała i wynosi ~ 2.5 Å. Modele M1, M2 i M3 mają więc konformacje zwarte. Generalnie można zauważyć, że wraz ze wzrostem wielkości modelu wydłuża się dystans między atomami Ni_p i Ni_d , a skraca między atomami Ni_p oraz Fe1.



Rysunek 5.8: Zoptymalizowane geometrie klastra A na różnych stopniach utlenienia dla modeli M2 i M3. Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=20$. Otrzymano tylko struktury zwarte klastra A

Gęstości spinowe i ładunki NBO na fragmentach klastra A dla trzech stopniach utlenienia zostały zebrane w Tablicy 5.4. Przedstawiony rozkład gęstości spinowych pokazuje, że A_{ox} posiada konfigurację elektronową $[Fe_4S_4]^{+2}-Ni_p^{+2}Ni_d^{+2}$; A_{red1} $[Fe_4S_4]^{+2}-Ni_p^{+1}Ni_d^{+2}$, a niesparowany elektron jest zlokalizowany na Ni_p ; natomiast A_{red2} $[Fe_4S_4]^{+1}-Ni_p^{+1}Ni_d^{+2}$ i występuje tu sprzężenie antyferromagnetyczne między Ni_p i kubanem o czym świadczą przeciwne

znaki gęstości spinowych na wymienionych fragmentach cząsteczki. Dla jednoelektronowo zredukowanych modeli M1, M2 i M3 gęstości spinowe na atomie Ni_p są duże i przekraczają wartość -0.520 . Ogólna zależność wynikająca z danych zawartych w Tablicy 5.4 jest taka, że w większości przypadków im wyższa wartość stałej dielektrycznej (ϵ) tym większa gęstość spinowa i większe ładunki NBO pojawiają się na fragmentach klastra A, natomiast wpływ powiększania wielkości modelu jest niewielki (wyjątek stanowi tu model M0). Rozkład elektronów w strukturach A_{red1} i A_{red2} sugeruje, że rolą kubanu oraz Ni_d jest stabilizacja różnych stopni utlenienia proksymalnego atomu niklu (Ni_p) przez przyjmowanie nadmiarowej gęstości elektronowej i tym samym zabezpieczenie go przed niepożądanymi reakcjami.

Tablica 5.2: Energia struktur zoptymalizowanych dla modeli klastra A na różnych stopniach utlenienia. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 12, 20, 80$

MODEL	$\epsilon=$			4	12	20	80
M0		ŁADUNEK	SPIN	E+12820[a.u.]			
	A_{ox}	-2	0	-5.44285	–	-5.48702	-5.49618
	A_{red1}	-3	1/2	-5.52400	–	-5.61444	-5.63225
	A_{red2}	-4	0	-5.56281	–	-5.71726	-5.74750
M0a ^{b)}				E+12820[a.u.]			
	A_{ox}	-2	0	-5.42663	–	-5.47334	-5.48171
	A_{red1}	-3	1/2	-5.51997	–	-5.60745	-5.62479
	A_{red2}	-4	0	-5.55638	–	-5.70736	-5.73961
M1				E+13390[a.u.]			
	A_{red1}	-3	1/2	-9.02255	-9.09559	-9.11102	-9.12890
	A_{red2}	-4	0	-9.07431	-9.19828	-9.22441	-9.25462
M1a ^{b)}				E+13390[a.u.]			
	A_{ox}	-2	0	-8.92441	-8.96513	-8.97407	-8.98459
	$A_{red1}^a)$	-3	1/2	-9.01720	-9.09059	-9.10607	-9.12395
	A_{red2}	-4	0	-9.05289	-9.17630	-9.20231	-9.23246
M2				E+15320[a.u.]			
	A_{ox}	-2	0	–	-8.19354	-8.20430	-8.21727
	A_{red1}	-3	1/2	–	-8.32901	-8.34495	-8.36401
M3				E+16030[a.u.]			
	A_{ox}	-2	0	–	-0.20147	-0.21017	-0.22080
	A_{red1}	-3	1/2	–	-0.34385	-0.35555	-0.36955
	A_{red2}	-4	0	–	-0.45869	-0.47417	-0.49566

^{a)} Odległość $Ni_p-S4=2.9$ Å została zamrożona w trakcie optymalizacji

^{b)} Literą a w nazwie modelu oznaczono struktury o konformacji rozwartej

Tablica 5.3: Wybrane, zoptymalizowane odległości [Å] między atomami dla modeli klastra A na różnych stopniach utlenienia. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 12, 20, 80$

MODEL	$\epsilon=$	Ni _p -Ni _d				Ni _p -Fe1				Ni _p -S4			
		4	12	20	80	4	12	20	80	4	12	20	80
M0	A _{ox}	2.864	-	2.841	2.844	3.747	-	3.786	3.745	4.178	-	4.297	4.487
	A _{red1}	2.699	-	2.688	2.683	2.572	-	2.569	2.563	3.287	-	3.307	2.563
	A _{red2}	2.698	-	2.655	2.652	2.507	-	2.467	2.464	3.363	-	3.511	3.518
M0a ^{b)}	A _{ox}	2.542	-	2.531	2.540	4.039	-	4.030	4.028	4.475	-	4.479	4.466
	A _{red1}	2.637	-	2.623	2.619	4.002	-	3.925	3.921	4.858	-	4.803	4.804
	A _{red2}	2.666	-	2.625	2.607	4.065	-	3.987	3.882	4.955	-	4.896	4.725
M1	A _{red1}	3.129	3.127	3.121	3.113	2.608	2.601	2.600	2.598	2.292	2.301	2.303	2.304
	A _{red2}	3.163	3.142	3.132	3.124	2.506	2.494	2.490	2.484	2.260	2.261	2.261	2.263
M1a ^{b)}	A _{ox}	2.961	2.963	2.964	2.965	2.829	2.832	2.833	2.835	3.298	3.316	3.323	3.323
	A _{red1} ^{a)}	2.929	2.916	2.914	2.912	2.719	2.709	2.709	2.706	2.900	2.900	2.900	2.900
	A _{red2}	2.678	2.661	2.653	2.651	3.585	3.580	3.574	3.573	3.572	3.604	3.612	3.644
M2	A _{ox}	-	2.905	2.906	2.908	-	3.007	3.001	2.992	-	3.466	3.477	3.492
	A _{red1}	-	3.135	3.136	3.138	-	2.582	2.580	2.577	-	2.326	2.328	2.330
	A _{red2}	-	3.133	3.136	3.145	-	2.464	2.462	2.461	-	2.280	2.281	2.281
M3	A _{ox}	-	2.880	2.880	2.871	-	2.938	2.937	2.955	-	3.370	3.381	3.432
	A _{red1}	-	3.093	3.091	3.091	-	2.583	2.583	2.583	-	2.350	2.354	2.359
	A _{red2}	-	3.129	3.129	3.133	-	2.510	2.510	2.508	-	2.259	2.258	2.259

a) Odległość Ni_p-S4=2.9 Å została zamrożona w trakcie optymalizacji

b) Literą a w nazwie modelu oznaczono struktury o konformacji rozwartej

Tablica 5.4: Gęstości spinowe i ładunki NBO dla modeli klastru A na różnych stopniach utlenienia. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 12, 20, 80$

MODEL	$\epsilon=$	Gęstości spinowe				Ładunki NBO				Gęstości spinowe				Ładunki NBO			
		M0				M0				M0 ^(a)				M0 ^(b)			
		4	12	20	80	4	12	20	80	4	12	20	80	4	12	20	80
MODEL A _{ox}	Ni _p	0.023	-	0.027	0.028	0.134	-	0.136	0.134	0.037	-	0.032	0.031	0.214	-	0.235	0.237
	Ni _d	0.011	-	0.009	0.009	0.072	-	0.063	0.061	0.239	-	0.221	0.246	0.136	-	0.130	0.126
	Fe ₄ S ₄	0.179	-	0.169	0.173	-0.728	-	-0.736	-0.735	0.013	-	0.028	0.028	-0.786	-	-0.807	-0.815
	Ni _p	0.185	-	0.166	0.176	0.050	-	0.042	0.045	-0.581	-	-0.582	-0.581	0.021	-	0.028	0.026
	Ni _d	0.001	-	0.001	0.001	0.069	-	0.060	0.057	0.063	-	0.054	0.053	0.068	-	0.060	0.057
MODEL A _{red1}	Fe ₄ S ₄	-0.542	-	-0.569	-0.558	-0.949	-	-1.001	-1.013	0.048	-	0.040	0.036	-0.839	-	-0.884	-0.892
	Ni _p	0.548	-	0.477	0.483	0.060	-	0.001	0.012	0.531	-	-0.593	-0.581	-0.021	-	-0.015	-0.052
	Ni _d	0.030	-	0.034	0.036	0.057	-	0.039	0.034	-0.029	-	-0.045	-0.052	0.049	-	0.042	0.038
	Fe ₄ S ₄	-0.624	-	-0.529	-0.534	-1.199	-	-1.283	-1.311	0.730	-	0.858	-0.719	-1.178	-	-1.321	-1.279
MODEL A _{ox}	Ni _p	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.116	-	-0.118	-0.121	0.112	-	0.138	0.148
	Ni _d	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.003	-	-0.004	-0.004	0.081	-	0.069	0.064
	Fe ₄ S ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.022	-	-0.028	-0.025	-0.746	-	-0.774	-0.781
	Ni _p	-0.522	-	-0.576	-0.588	0.060	0.059	0.059	0.056	-0.573	-	-0.558	-0.554	0.144	-	0.148	0.150
	Ni _d	0.054	0.059	0.062	0.065	0.051	0.056	0.058	0.062	0.054	0.054	0.055	0.055	0.057	0.061	0.062	0.065
MODEL A _{red1}	Fe ₄ S ₄	-0.033	-0.057	-0.040	-0.020	-0.784	-0.841	-0.857	-0.877	0.026	0.027	0.025	0.026	-0.832	-0.884	-0.897	-0.914
	Ni _p	-0.291	-0.299	-0.298	-0.298	-0.054	-0.083	-0.093	-0.107	-0.485	-0.531	-0.538	-0.547	0.011	0.001	-0.003	-0.006
	Ni _d	0.001	0.000	0.000	-0.001	0.046	0.039	0.039	0.038	-0.061	-0.071	-0.075	-0.081	0.085	0.059	0.062	0.070
	Fe ₄ S ₄	0.274	0.275	0.272	0.269	-1.011	-1.084	-1.103	-1.128	0.601	0.646	0.656	0.672	-1.039	-1.137	-1.161	-1.196
MODEL A _{ox}	Ni _p	-	-	0.112	0.114	0.116	-	0.152	0.158	0.123	-	0.124	0.124	-	0.152	0.158	0.168
	Ni _d	-	0.017	0.017	0.015	-	0.075	0.076	0.078	0.013	0.014	0.017	0.017	0.069	0.072	0.072	0.075
	Fe ₄ S ₄	-	0.014	0.013	0.012	-	-0.608	-0.607	-0.606	0.006	0.002	-0.011	-0.011	-0.590	-0.593	-0.594	-0.594
	Ni _p	-	-0.573	-0.575	-0.575	-	0.090	0.090	0.089	-0.566	-0.574	-0.567	-0.567	0.108	0.115	0.115	0.114
	Ni _d	-	0.086	0.084	0.083	-	0.076	0.077	0.077	0.060	0.064	0.061	0.061	0.073	0.076	0.076	0.077
MODEL A _{red1}	Fe ₄ S ₄	-	-0.002	-0.005	-0.007	-	-0.765	-0.767	-0.773	-0.019	-0.022	-0.022	-0.022	-0.735	-0.753	-0.757	-0.757
	Ni _p	-	-0.313	-0.312	-0.311	-	-0.050	-0.058	-0.067	-	-0.413	-0.421	-0.416	-0.058	-0.052	-0.063	-0.063
	Ni _d	-	-0.002	-0.002	-0.001	-	0.053	0.051	0.048	-0.002	-0.002	-0.003	-0.003	0.058	0.055	0.053	0.053
	Fe ₄ S ₄	-	0.296	0.292	0.284	-	-1.006	-1.016	-1.030	0.424	0.435	0.421	0.421	-0.883	-0.900	-0.900	-0.922

a) Dla struktury A_{red1} odległość Ni_p-S4=2.9 Å została zamrożona w trakcie optymalizacji

b) Literą a w nazwie modelu oznaczono struktury o konformacji rozwartej

Dobra zgodność otrzymanych, zoptymalizowanych parametrów geometrycznych klastrera A i jego właściwości elektronowych klastrera A z danymi doświadczalnymi [85] i dostępnymi pracami obliczeniowymi [13, 80] dowodzi, że przyjęta metodyka obliczeń pozwala na poprawne modelowanie geometrii klastrera A, a sama geometria zależy silnie od przyjętego modelu strukturalnego, natomiast wpływ stałej dielektrycznej w obliczeniach PCM na geometrię jest niewielki. Nie należy oczekiwać bardzo dobrej zgodności z eksperymentem ponieważ same dane doświadczalne pokazują duży rozrzut wyników, co potwierdza elastyczność strukturalną pozwalającą na dostosowanie klastrera do różnych konformacji otaczającego go białka [52]. Analizując zmiany wartości gęstości spinowych i ładunków NBO na fragmentach klastrera A widzimy wpływ wzrostu stałej dielektrycznej, natomiast oddziaływanie wielkości modelu ma mniejsze znaczenie.

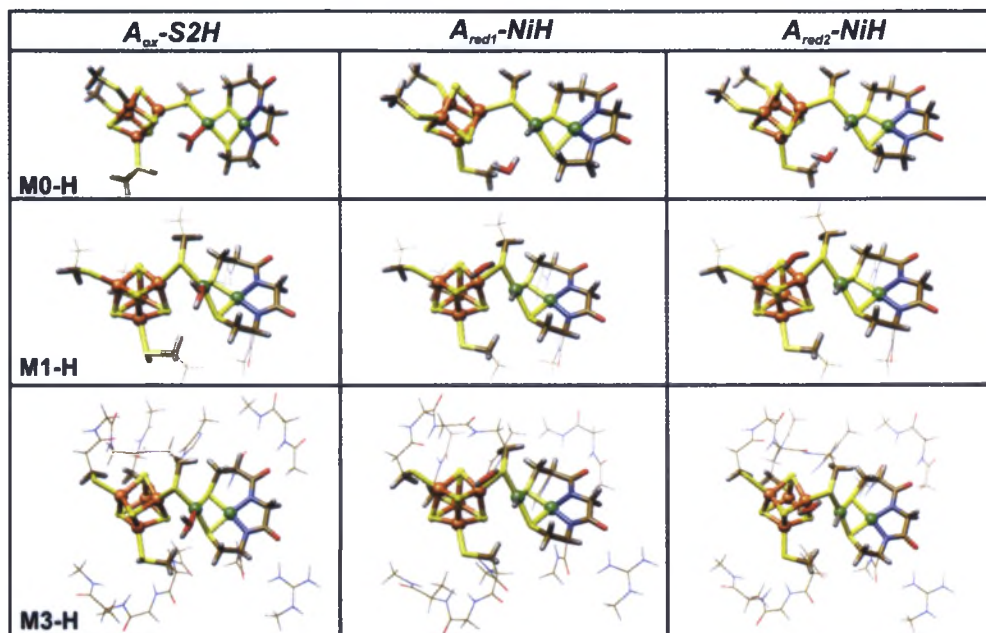
5.2.2 Protonowany klaster A

Doświadczalnie stwierdzono, że dwuelektronowo zredukowany klaster A (A_{red2}) jest nietrwały, a protonacja jest jednym ze sposobów stabilizacji jego struktury [19]. Z tego względu, optymalizacji geometrii poddano formy klastrera A z protonem na wszystkich stopniach utlenienia, a jako miejsca protonacji uwzględniono atom Ni_p oraz atomy siarki (S1, S2, S3, S6; miejsca oznaczone strzałkami, Rysunek 5.5).

Obliczenia uwzględniające protonację klastrera A zostały wykonane po raz pierwszy i opublikowane w pracy [80]. Zoptymalizowane parametry strukturalne dla modeli klastrera A z protonem, odpowiadające najniższej energii (Tablica 5.5) zostały zebrane w Tablicy 5.6. Na Rysunku 5.9 pokazano zoptymalizowane geometrie protonowanych struktur, otrzymane dla $\epsilon=20$. W Załączniku B znajdują się Tablice B1, B2 i B3, które zawierają energie, wybrane parametry geometryczne, gęstości spinowe oraz ładunki NBO dla modeli M1-H (A_{red2}) i M3-H (A_{red1} i A_{red2}) dla wszystkich rozpatrywanych miejsc protonacji. Wartości najniższej energii dla zostały podane pogrubioną czcionką.

Dla form utlenionych (A_{ox}) wszystkich rozpatrywanych modeli klastrera A, najniższą energię mają struktury gdzie protonacja ma miejsce na atomie siarki S2 (A_{ox} -S2H), a cząsteczka wody nadal związana jest z atomem Ni_p . Protonacja struktur zredukowanych prowadzi do powstania wodorków (A_{red1} -NiH i A_{red2} -NiH), w których proton związany jest z proksymalnym atomem niklu (Ni_p). Analizując odległości zawarte w Tablicy 5.6 widać, że dla wszystkich protonowanych modeli znaleziono tylko jedną konformację klastrera A. Dla modeli M0-H i M1-H można ją uznać za pośrednią między konformacją zwartą, a rozwartą. Dla modelu M1-H odległość Ni_p -Fe1 jest większa niż dla modelu M3-H, ponieważ możliwość zginania kąta Fe1-S6- Ni_p jest dodatkowo (oprócz zamrożonych atomów węgla) zablokowana przez obecność reszt aminokwasowych. Interesująca jest do-

bra zgodność ($\sim 0.1 \text{ \AA}$, $\epsilon=20$) geometrii protonowanych struktur dla modeli M1-H i M3-H z danymi krystalograficznymi dla 1RU3 (Tablica 5.1) [51].



Rysunek 5.9: Zoptymalizowane geometrie protonowanych struktur klastru A na różnych stopniach utlenienia. Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=20$. Przedstawiane są tylko te struktury spośród rozpatrywanych miejsc protonacji, którym odpowiada najniższa energia

Tablica 5.5: Energia struktur zoptymalizowanych protonowanych modeli klastra A na różnych stopniach utlenienia. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 12, 20, 80$

MODEL	$\epsilon=$			4	12	20	80
M0-H		ŁADUNEK	SPIN	E+12820[a.u.]			
	A _{ox} -S2H	-1	0	-5.89909	–	-5.92284	-5.92509
	A _{red1} -NiH	-2	1/2	-6.01680	–	-6.06034	-6.06909
	A _{red2} -NiH	-3	0	-6.11394	–	-6.20144	-6.21860
M1-H				E+13390[a.u.]			
	A _{ox} -S2H	-1	0	-9.38704	-9.40845	-9.41358	-9.41989
	A _{red1} -NiH	-2	1/2	-9.51510	-9.55262	-9.56066	-9.56998
	A _{red1} -NiH ^{a)}	-2	1/2	-9.51291	-9.55050	-9.55856	-9.56793
	A _{red2} -NiH	-3	0	-9.61206	-9.68538	-9.70081	-9.71860
M3-H				E+16030[a.u.]			
	A _{ox} -S2H	-1	0	–	-0.62189	-0.63085	-0.64225
	A _{red1} -NiH	-2	1/2	–	-0.78317	-0.79151	-0.80173
	A _{red2} -NiH	-3	0	–	-0.93486	-0.94657	-0.96073

^{a)} Odległość Ni_p-S4=2.9 Å została zamrożona w trakcie optymalizacji

Tablica 5.6: Wybrane, zoptymalizowane odległości [Å] między atomami dla protonowanych modeli klastra A na różnych stopniach utlenienia. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 12, 20, 80$

MODEL	$\epsilon=$	Ni_p-Ni_d				Ni_p-Fe1				Ni_p-S4				$Ni_p(S)-H$			
		4	12	20	80	4	12	20	80	4	12	20	80	4	12	20	80
M0-H	A_{Ox}	2.820	-	2.848	2.831	3.792	-	3.857	3.820	4.579	-	4.537	4.563	1.364	-	1.363	1.363
	A_{red1}	2.704	-	2.701	2.696	3.817	-	3.824	3.836	4.661	-	4.602	4.619	1.477	-	1.478	1.478
	A_{red2}	2.848	-	2.832	2.831	3.856	-	3.688	3.770	4.700	-	4.356	4.565	1.480	-	1.481	1.482
M1-H	A_{Ox}	2.903	2.899	2.902	2.906	3.011	3.052	3.047	3.042	3.469	3.549	3.562	3.570	1.364	1.364	1.364	1.364
	A_{red1}	2.988	2.983	2.983	2.983	2.705	2.715	2.716	2.718	2.490	2.489	2.489	2.489	1.472	1.472	1.473	1.473
	$A_{red1}^a)$	2.945	2.941	2.942	2.942	2.729	2.734	2.734	2.734	2.900	2.900	2.900	2.900	1.471	1.471	1.471	1.472
	A_{red2}	2.959	2.948	2.945	2.942	2.758	2.740	2.737	2.732	3.099	3.106	3.106	3.104	1.470	1.471	1.471	1.472
	A_{Ox}	-	2.862	2.865	2.872	-	2.983	2.977	2.970	-	3.545	3.547	3.549	-	1.362	1.362	1.361
M3-H	A_{red1}	-	2.969	2.968	2.966	-	2.683	2.687	2.690	-	2.564	2.563	2.564	-	1.470	1.470	1.470
	A_{red2}	-	2.917	2.917	2.914	-	2.689	2.696	2.696	-	3.121	3.119	3.147	-	1.469	1.469	1.470

$a)$ Odległość $Ni_p-S4=2.9$ Å została zamrożona w trakcie optymalizacji

Tablica 5.7: Gęstości spinowe i ładunki NBO dla protonowanych modeli klastru A na różnych stopniach utlenienia. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 12, 20, 80$

MODEL	$\epsilon=$	Gęstości spinowe				Ładunki NBO			
		4	12	20	80	4	12	20	80
		M0-H				M0-H			
A_{ox}	Ni_p	0.026	–	0.029	-0.035	0.016	–	0.131	0.142
	Ni_d	0.038	–	0.015	-0.026	0.084	–	0.072	0.070
	Fe_4S_4	0.269	–	0.288	0.115	-0.699	–	-0.601	-0.541
	H	0.003	–	0.003	0.004	0.177	–	0.184	0.190
A_{red1}	Ni_p	-0.193	–	-0.190	-0.224	-0.175	–	-0.189	-0.172
	Ni_d	-0.221	–	-0.217	-0.248	0.141	–	0.133	0.149
	Fe_4S_4	-0.345	–	-0.351	-0.251	-0.612	–	-0.591	-0.639
	H	0.014	–	0.015	0.015	-0.035	–	-0.029	-0.026
A_{red2}	Ni_p	0.039	–	0.039	0.036	-0.220	–	-0.235	-0.243
	Ni_d	0.007	–	0.006	0.007	0.053	–	0.039	0.037
	Fe_4S_4	0.035	–	0.058	0.056	-0.783	–	-0.813	-0.835
	H	0.005	–	0.005	0.005	-0.069	–	-0.079	-0.076
		M1-H				M1-H			
A_{ox}	Ni_p	-0.103	-0.102	-0.104	-0.106	0.118	0.138	0.145	0.156
	Ni_d	-0.018	-0.018	-0.017	-0.016	0.074	0.076	0.076	0.077
	Fe_4S_4	-0.249	-0.228	-0.223	-0.217	-0.581	-0.553	-0.545	-0.535
	H	0.005	-0.006	-0.006	-0.006	0.182	0.186	0.187	0.188
A_{red1}	Ni_p	0.072	0.105	0.107	0.109	-0.300	-0.295	-0.294	-0.292
	Ni_d	-0.060	0.070	0.071	0.072	0.082	0.091	0.093	0.097
	Fe_4S_4	-0.716	0.679	0.676	0.671	-0.459	-0.463	-0.463	-0.463
	H	0.004	-0.008	-0.008	-0.008	0.084	0.082	0.081	0.081
$A_{red1}^a)$	Ni_p	0.044	0.032	0.029	0.028	-0.224	-0.220	-0.218	-0.216
	Ni_d	-0.042	0.047	0.048	0.049	0.075	0.081	0.084	0.087
	Fe_4S_4	-0.870	-0.853	-0.842	-0.844	-0.475	-0.481	-0.482	-0.482
	H	0.000	-0.001	-0.001	-0.001	0.052	0.048	0.047	0.046
A_{red2}	Ni_p	-0.133	-0.145	-0.147	-0.150	-0.235	-0.237	-0.237	-0.236
	Ni_d	-0.009	-0.010	-0.011	-0.012	0.040	0.042	0.043	0.045
	Fe_4S_4	0.030	0.031	0.033	0.034	-0.742	-0.789	-0.802	-0.818
	H	0.001	0.004	0.004	0.004	0.013	0.019	0.017	0.015
		M3-H				M3-H			
A_{ox}	Ni_p	–	-0.124	-0.127	-0.129	–	0.159	0.167	0.180
	Ni_d	–	-0.020	-0.021	-0.019	–	0.079	0.080	0.081
	Fe_4S_4	–	-0.157	-0.169	-0.155	–	-0.443	-0.432	-0.412
	H	–	-0.006	-0.006	-0.006	–	0.210	0.212	0.213
A_{red1}	Ni_p	–	0.070	0.071	0.082	–	-0.266	-0.264	-0.262
	Ni_d	–	0.064	0.063	0.069	–	0.106	0.108	0.113
	Fe_4S_4	–	0.720	0.721	0.704	–	-0.323	-0.318	-0.310
	H	–	-0.006	-0.006	-0.006	–	0.090	0.089	0.087
A_{red2}	Ni_p	–	-0.167	-0.160	-0.169	–	-0.230	-0.228	-0.226
	Ni_d	–	-0.013	0.014	-0.014	–	0.059	0.060	0.063
	Fe_4S_4	–	0.056	0.054	0.052	–	-0.668	-0.676	-0.682
	H	–	0.005	0.000	0.005	–	0.038	0.035	0.031

a) Odległość $Ni_p-S_4=2.9 \text{ \AA}$ została zamrożona w trakcie optymalizacji

W Tablicy 5.7 zebrano gęstości spinowe i ładunki NBO struktur klastrera A z protonem dla $\varepsilon=4, 12, 20$ i 80 . Dla modelu M1-H w strukturze jednoelektronowo zredukowanej (A_{red1}) niesparowany elektron znajduje się na kubanie żelazo-siarkowym [Fe_4-S_4]. Gęstość elektronowa w zależności od ε wynosi od -0.671 do -0.870 . Dla dużego modelu M3-H obserwuje się obniżenie gęstości spinowych w stosunku do mniejszych modeli, co może być spowodowane przesunięciem ładunku na skutek tworzenia się wiązań wodorowych pomiędzy resztami aminokwasowymi białka oraz atomami siarki i tlenu należącymi do klastrera A.

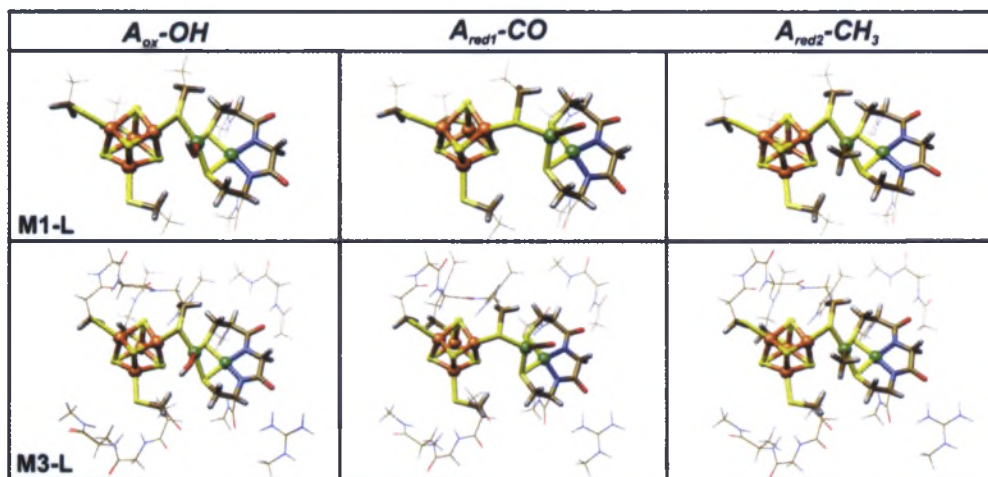
5.2.3 Klaster A z ligandami

Obliczenia optymalizacji geometrii wykonano również dla klastrera A z ligandami. Wybrano takie molekuly, które w trakcie procesu katalitycznego łączą się z proksymalnym atomem niklu (Ni_p). Obliczenia z grupą karbonylową ($-CO$) przeprowadzono dla jednoelektronowo zredukowanej struktury, która została wykryta eksperymentalnie (układ NiFeC) [60–62]. Z ligandem metylowym ($-CH_3$) optymalizację wykonano dla struktury dwuelektronowo zredukowanej, ponieważ została ona stwierdzona doświadczalnie [57, 86]. W formie utlenionej klaster A zawiera cząsteczkę wody skoordynowaną do atomu Ni_p . Obecność innych ligandów m. in. mrówczanu, SO , CO_2 czy azydku jest sugerowana pracach eksperymentalnych [43, 82, 83]. Autorzy artykułu opisującego strukturę krystalograficzną IOAO [43] wychodzą z propozycją, że jest to anion mrówczanowy. Z kolei udział jonu OH^- w mechanizmie katalitycznym enzymu ACS sugerują autorzy pracy [87]. Uzasadnia to wybór ligandów prezentowanych w niniejszej pracy.

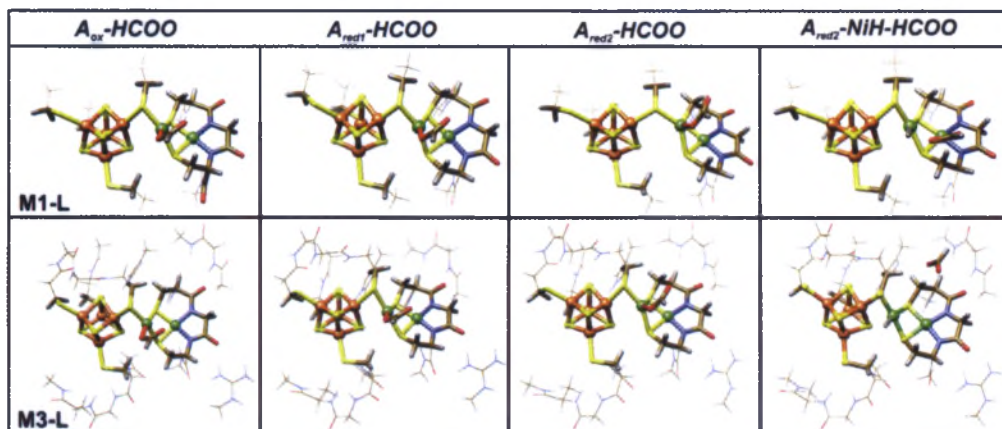
Na Rysunkach 5.10 i 5.11 przedstawiono zoptymalizowane geometrie klastrera A na różnych stopniach utlenienia dla modeli M1-L i M3-L z ligandami ($-OH$, $-CO$, $-CH_3$, $-HCOO$) dla $\varepsilon=20$. W Tablicy 5.8 zamieszczono wartości energii zoptymalizowanych struktur, a w Tablicy 5.9 zebrano wybrane, zoptymalizowane odległości między atomami. Kompleksy $A_{ox}-OH$, $A_{red2}-CH_3$, $A_{ox}-HCOO$ i $A_{red2}-NiH-HCOO$ zawierają atom niklu na +II stopniu utlenienia, dla którego otoczenie Ni_p jest planarne. Dla tych struktur różnice odległości między atomami, porównując model M1-L i M3-L (Tablica 5.9), mieszczą się w zakresie $0.02-0.07$ Å. W kompleksach $A_{red1}-CO$, $A_{red1}-HCOO$ i $A_{red2}-HCOO$ nikiel występuje na +I stopniu utlenienia i charakteryzuje się tetraedryczną lub zniekształconą tetraedryczną koordynacją. Porównując te struktury, pomiędzy modelami M1-L i M3-L, można zauważyć duże różnice w wartościach odległości Ni_p-Fe1 . Szczególnie uwidacznia się to dla struktury $A_{red1}-CO$, gdzie odległość Ni_p-Fe1 dla modelu M1-L ma wartość 4.100 Å, podczas gdy dla modelu M3-L wynosi 3.298 Å (Tablica 5.9, $\varepsilon=20$). Odnosząc się do danych literaturowych zebranych w Tablicy 5.1 widać, że tak duże odległości Ni_p-Fe1 występują dla atomów Zn (3.736 Å, [43]) i Cu (3.471 Å i 3.545 Å, [82]) w miejscu M_p . Struktura tetra-

edryczna ma konformację najbardziej rozwartą, a białko zapobiega jej pełnej relaksacji.

Gęstości spinowe i ładunki NBO dla modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia z ligandami ($-\text{OH}$, $-\text{CO}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{HCOO}$, $-\text{H}$) zostały przedstawione w Tabelicy 5.10. W cząsteczce $A_{red1}\text{-CO}$ niesparowany elektron zlokalizowany jest głównie na atomie Ni_p , co potwierdza konfigurację elektronową $[\text{Fe}_4\text{S}_4]\text{Ni}_p^{1+}(\text{CO})\text{Ni}_d^{2+}$. Zwiększenie gęstości elektronowej wynoszące 0.262 dla modelu M1-L (Tabelica 5.10, $\epsilon=20$) można zauważyć także w tej strukturze na dystalnym atomie nikielu (Ni_d). Dwuelektronowo zredukowany metylowany klaster A ($A_{red2}\text{-CH}_3$) posiada małą, równą 0.006 dla modelu M1-L (Tabelica 5.10, $\epsilon=20$) gęstość spinową na Ni_p i jego konfiguracja elektronowa może być opisana jako $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}\text{Ni}_p^{2+}(\text{CH}_3)\text{Ni}_d^{2+}$.



Rysunek 5.10: Zoptymalizowane geometrie klastera A z ligandami ($-\text{OH}$, $-\text{CO}$, $-\text{CH}_3$) na atomie Ni_p . Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=20$



Rysunek 5.11: Z optymalizowanych geometrii klastera A na różnych stopniach utlenienia z anionem mrówczanowym jako ligandem na atomie Ni_p dla modeli M1 i M3 oraz dla struktury z protonem. Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=20$

Tablica 5.8: Energia struktur zoptymalizowanych dla modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia z ligandami (L=OH, CO, CH₃, HCOO, H). Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=12, 20, 80$

MODEL	$\epsilon=$			12	20	80
M1-L		ŁADUNEK	SPIN	E+13300[a.u.]		
	A_{ox} -OH	-3	0	-98.48822	-98.50411	-98.5225
	A_{red1} -CO	-3	1/2	-136.01351	-136.02889	-136.04671
	A_{red2} -CH ₃	-3	0	-62.53074	-62.54633	-62.56436
				E+13510[a.u.]		
	A_{ox} -HCOO	-3	0	-1.89077	-1.90641	-1.92487
	A_{red1} -HCOO	-4	1/2	-1.98737	-2.01380	-2.04464
	A_{red2} -HCOO	-5	0	-2.06035	-2.10015	-2.14814
	A_{red2} -NiH-HCOO	-4	0	-2.58742	-2.59662	-2.62780
	M3-L				E+15900[a.u.]	
A_{ox} -OH		-3	0	-129.73617	-129.74830	-129.76310
A_{red1} -CO		-3	1/2	-167.24826	-167.25981	-167.27378
A_{red2} -CH ₃		-3	0	-93.78250	-93.79412	-93.80815
				E+16140[a.u.]		
A_{ox} -HCOO		-3	0	-3.12989	-3.14194	-3.15649
A_{red1} -HCOO		-4	1/2	-3.24249	-3.26009	-3.28295
A_{red2} -HCOO		-5	0	-3.36457	-3.36653	-3.40182
A_{red2} -NiH-HCOO		-4	0	-3.82655	-3.84594	-3.86970

Tablica 5.9: Wybrane, zoptymalizowane odległości [Å] między atomami dla modeli klastru A na różnych stopniach utlenienia z ligandami (L=–OH, –CO, –CH₃, –HCOO, –H). Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 12, 20, 80$

MODEL	$\epsilon=$	Ni _p -Ni _d				Ni _p -FeI				Ni _p -S4				Ni _p -L			
		12	20	80	80	12	20	80	80	12	20	80	80	12	20	80	
M1-L	A _{ox} -OH	2.939	2.938	2.934		2.901	2.900	2.891		3.511	3.511	3.502		1.876	1.877	1.877	
	A _{red1} -CO	2.597	2.569	2.592		4.103	4.100	4.097		4.388	4.392	4.389		1.765	1.766	1.766	
	A _{red2} -CH ₃	3.021	3.019	3.018		2.835	2.825	2.814		3.292	3.296	3.311		1.971	1.971	1.971	
	A _{ox} -HCOO	2.974	2.957	2.966		3.035	2.987	3.009		3.480	3.522	3.463		1.947	1.815	1.948	
	A _{red1} -HCOO	2.951	2.968	2.954		3.106	3.000	2.955		3.659	3.607	3.587		2.025	2.039	2.041	
	A _{red2} -HCOO	2.818	2.824	2.775		3.816	3.788	3.875		4.177	4.150	4.181		2.027	2.032	2.040	
	A _{red2} -NiH-HCOO	2.976	2.966	2.975		2.675	2.696	2.685		3.042	3.100	3.042		1.469	1.469	1.469	
M3-L	A _{ox} -OH	2.905	2.907	2.912		2.842	2.848	2.860		3.319	3.328	3.354		1.881	1.882	1.882	
	A _{red1} -CO	2.714	2.729	2.732		3.335	3.293	3.270		3.941	3.919	3.912		1.761	1.761	1.760	
	A _{red2} -CH ₃	2.968	2.970	2.971		2.757	2.758	2.758		3.301	3.312	3.324		1.972	1.971	1.971	
	A _{ox} -HCOO	2.918	2.917	2.916		2.940	2.941	2.942		3.376	3.382	3.378		1.939	1.940	1.942	
	A _{red1} -HCOO	2.923	2.994	2.955		2.874	2.746	2.815		3.191	2.923	3.064		1.905	2.022	2.027	
	A _{red2} -HCOO	2.801	2.802	2.815		2.962	2.961	2.922		3.569	3.568	3.559		2.053	2.053	2.059	
A _{red2} -NiH-HCOO	2.959	2.951	2.936		2.677	2.680	2.702		2.881	2.920	3.019		1.469	1.470	1.471		

Tablica 5.10: Gęstości spinowe i ładunki NBO dla modeli klastrera A na różnych stopniach utlenienia z ligandami (L=–OH, –CO, –CH₃, –HCOO, –H). Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=12, 20, 80$

MODEL	$\epsilon=$	Gęstości spinowe						Ładunki NBO						
		12		20		80		12		20		80		
		MI-L	MI-L	MI-L	MI-L	MI-L	MI-L	M3-L	M3-L	M3-L	M3-L	M3-L		
A _{ox} -OH	Ni _p	0.135	0.138	0.140	0.114	0.112	0.109	0.141	0.141	0.141	0.141	0.127	0.128	0.129
	Ni _d	0.004	0.004	0.005	0.031	0.031	0.033	0.005	0.005	0.005	0.005	0.049	0.050	0.053
	Fe ₄ S ₄	0.030	0.028	0.025	-0.772	-0.782	-0.793	0.041	0.040	0.039	0.039	-0.634	-0.642	-0.653
	L	-0.020	-0.020	-0.019	-0.469	-0.471	-0.475	-0.018	-0.018	-0.018	-0.018	-0.454	-0.458	-0.463
	L	-0.516	-0.516	-0.515	-0.271	-0.273	-0.277	-0.452	-0.447	-0.443	-0.443	-0.210	-0.211	-0.213
A _{red1} -CO	Ni _p	0.261	0.262	0.265	0.140	0.142	0.144	0.094	0.087	0.086	0.078	-0.672	-0.681	0.080
	Ni _d	-0.092	-0.092	-0.090	-0.745	-0.757	-0.774	-1.834	-1.825	-1.824	-0.039	0.040	0.040	0.040
	Fe ₄ S ₄	-0.029	-0.029	-0.029	0.024	0.027	0.028	-0.038	-0.041	-0.042	-0.039	0.039	0.040	0.040
	L	-0.149	-0.153	-0.159	0.004	0.006	0.008	-0.178	-0.180	-0.182	-0.182	0.015	0.016	0.018
	L	-0.006	-0.006	-0.007	0.031	0.033	0.034	-0.009	-0.009	-0.009	-0.009	0.046	0.047	0.048
A _{red2} -CH ₃	Fe ₄ S ₄	0.035	0.039	0.044	-0.774	-0.785	-0.810	-0.084	-0.085	-0.086	-0.086	-0.653	-0.663	-0.676
	L	0.002	0.002	0.001	-0.199	-0.198	-0.196	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.173	-0.173	-0.174
	Ni _p	-0.109	-0.111	-0.113	0.136	0.138	0.132	0.110	0.112	0.108	0.138	0.137	0.132	
	Ni _d	-0.006	-0.004	-0.007	0.043	0.047	0.046	0.005	0.005	0.005	0.052	0.053	0.055	
	Fe ₄ S ₄	-0.025	-0.025	-0.025	-0.742	-0.754	-0.766	-0.024	-0.023	-0.024	-0.024	-0.525	-0.528	-0.536
A _{red1} -HCOO	L	-0.005	-0.005	-0.005	-0.622	-0.626	-0.624	0.006	0.006	0.006	0.006	-0.602	-0.605	-0.609
	Ni _p	-0.459	-0.437	-0.453	0.185	0.191	0.171	-0.578	-0.867	-0.608	0.215	0.242	0.210	
	Ni _d	0.007	0.007	0.008	0.034	0.043	0.030	-0.002	-0.020	0.000	0.052	0.062	0.048	
	Fe ₄ S ₄	0.270	0.281	0.251	-0.953	-0.963	-0.985	-0.234	-0.203	-0.195	-0.811	-0.787	-0.838	
	L	-0.034	-0.046	-0.037	-0.743	-0.739	-0.742	-0.054	-0.080	-0.055	-0.702	-0.759	-0.713	
A _{red2} -HCOO	Ni _p	0.678	0.666	0.693	0.188	0.177	0.163	0.487	0.502	0.492	0.164	0.156	0.145	
	Ni _d	0.008	0.010	0.014	0.012	0.011	0.017	0.020	0.015	0.015	0.048	0.030	0.028	
	Fe ₄ S ₄	-0.860	-0.852	-0.876	-1.324	-1.352	-1.383	-0.687	-0.692	-0.691	-1.245	-1.195	-1.233	
	L	0.031	0.038	0.032	-0.783	-0.781	-0.778	0.053	0.051	0.050	-0.747	-0.757	-0.758	
	Ni _p	-0.165	-0.183	-0.173	-0.237	-0.216	-0.231	-0.107	-0.110	-0.116	-0.254	-0.249	-0.259	
A _{red2} -NiH-HCOO	Ni _d	-0.011	-0.012	-0.012	0.040	0.044	0.042	-0.003	-0.005	-0.006	0.062	0.061	0.060	
	Fe ₄ S ₄	0.098	0.115	0.105	-0.751	-0.775	-0.786	0.041	0.051	0.053	-0.566	-0.568	-0.574	
	L	0.000	0.000	0.000	0.023	0.031	0.020	0.000	0.000	0.000	0.025	0.028	0.020	

5.3 pK_a

W Tabelcy 5.11 zostały zebrane wartości pK_a obliczone ze wzoru 5.22 dla modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia, natomiast na Rysunku 5.12 pokazano ich zależność od stałej dielektrycznej ϵ . Do wyliczenia wartości pK_a zostały użyte struktury protonowane o najniższej energii zebrane w Tabelcy 5.5 (A_{ox} -S2H, A_{red1} -NiH i A_{red2} -NiH). Do Tabelcy 5.11 i Rysunku 5.12 włączono także wartości pK_a dla struktur A_{ox} -OH i A_{red2} -HCOO dla modeli M1-L i M3-L.

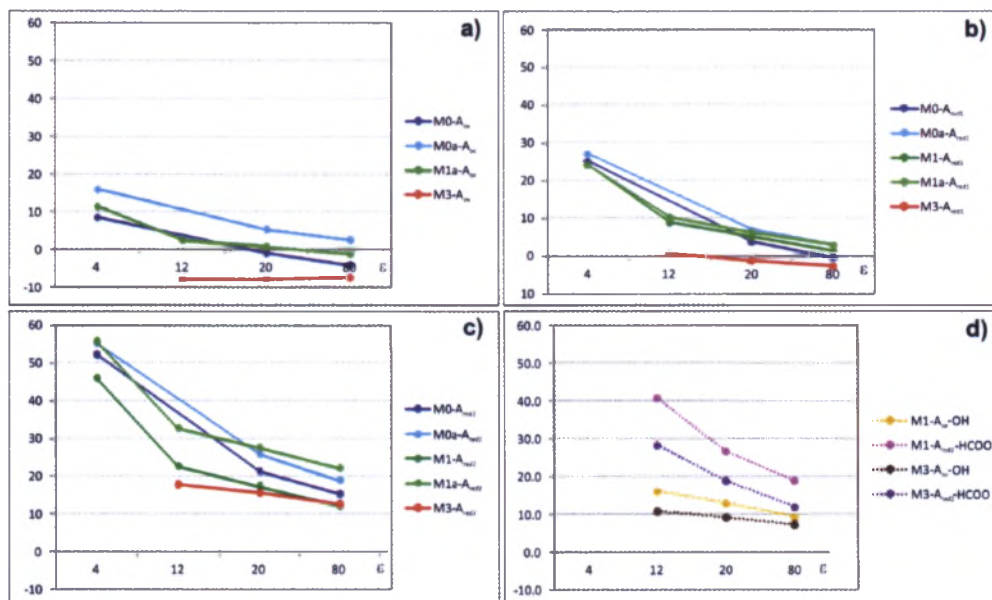
Tablica 5.11: Wartości pK_a obliczone dla modeli klastera A na różnych stopniach utlenienia. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 12, 20, 80$. Wartości pK_a dla modelu M2 nie były wyznaczane

	$\epsilon=$	4	12	20	80	4	12	20	80
MODEL		M0				M0a			
A_{ox}		8.5	–	-0.9	-4.1	16.0	–	5.4	2.6
A_{red1}		25.3	–	3.7	-0.4	27.2	–	7.0	3.0
A_{red2}		52.1	–	21.3	15.3	55.3	–	25.9	19.0
MODEL		M1				M1a ^{a)}			
A_{ox}		–	–	–	–	11.4	2.5	0.8	-1.1
A_{red1}		24.2	8.9	5.1	1.5	25.2	10.2	6.4	2.9
A_{red2}		46.0	22.7	17.4	12.1	55.8	32.8	27.6	22.2
MODEL		M2				M3			
A_{ox}		–	–	–	–	–	-8.0	-7.9	-7.5
A_{red1}		–	–	–	–	–	0.7	-1.2	-2.6
A_{red2}		–	–	–	–	–	17.7	15.6	12.6
MODEL		M1-L				M3-L			
A_{ox} -OH		–	16.0	12.8	9.2	–	10.7	9.1	7.2
A_{red2} -HCOO		–	40.7	26.6	18.9	–	28.2	18.8	11.9

^{a)} Dla struktury A_{red1} odległość Ni_p -S4=2.9 Å została zamrożona w trakcie optymalizacji.

Struktura A_{ox} -OH została wzięta pod uwagę, celem sprawdzenia czy prawdopodobne jest aby grupa $-OH^-$ była związana z atomem Ni_p [87], podczas gdy struktura A_{red2} -HCOO może być zaangażowana w mechanizm redukcji utlenionej formy klastera A. Analiza obliczonych wartości pK_a nasunęła kilka wniosków. Stała dielektryczna $\epsilon=4$ nie odtwarza prawidłowo pK_a , otrzymane wartości są zbyt duże, dlatego też została pominięta w obliczeniach dla dużych modeli M2 i M3. Wartości pK_a obliczone dla A_{ox} i A_{red1} są małe dla wszystkich zastosowanych modeli. Dla form A_{red2} wyliczone wartości pK_a są zawsze większe od 7, co potwierdza, że w warunkach fizjologicznego pH, istnieją one w formie protonowanej. Podobnie jest dla struktury A_{ox} -OH (model M1-L), gdzie obliczona wartość pK_a jest równa 12.8 (Tablica 5.11, $\epsilon=20$). W środowisku obojętnym, jon OH^-

będzie ulegał protonacji co oznacza, że forma utleniona klastra A będzie koordynować wodę a nie anion hydroksylowy. Wartości pK_a obliczone dla struktury A_{red2} -HCOO są zbliżone dla M3-L (18.8) i M3 (15.6) dla $\epsilon=20$. Rysunek 5.12 pokazuje bardziej ogólną zależność, że wraz ze wzrostem wartości stałej dielektrycznej ϵ maleje wartość pK_a . Największa zmiana wartości pK_a występuje dla małego modelu M0, a najmniejsza dla modelu M3. Obecność reszt aminokwasowych obniża wartość pK_a o około 2 jednostki (z 17.4 dla M1 do 15.6 dla M3, $\epsilon=20$).

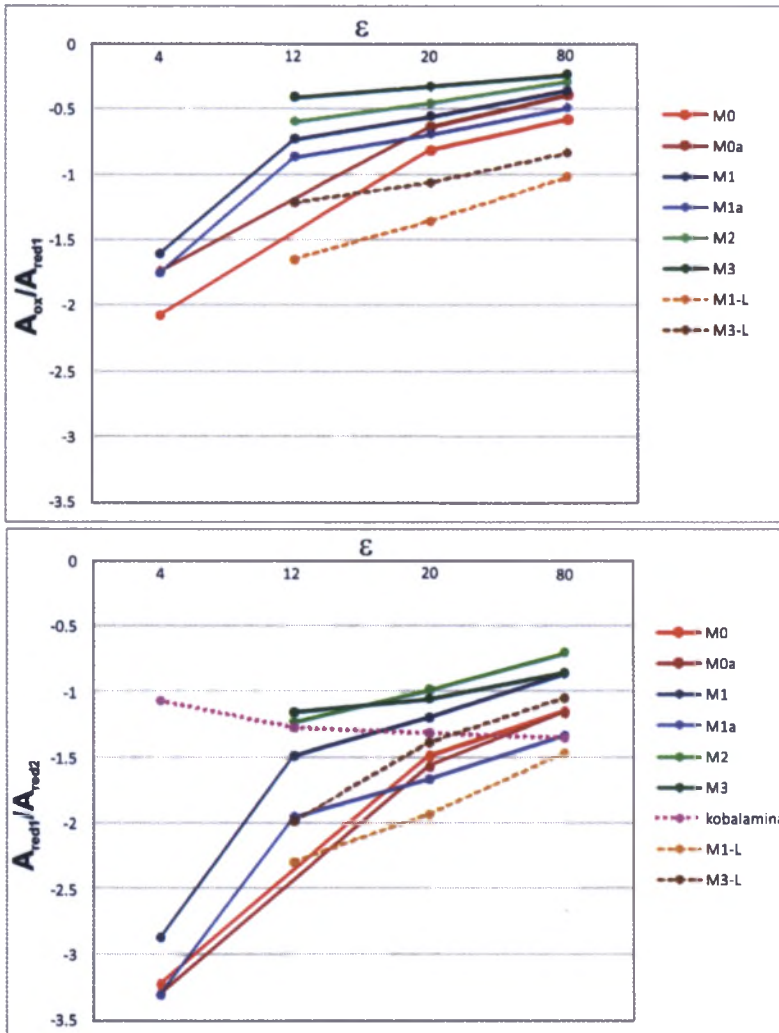


Rysunek 5.12: Zależność wartości pK_a od stałej dielektrycznej ϵ dla modeli klastra A stosowanych w obliczeniach. W panelach umieszczono różne stopnie utlenienia klastra A: a) A_{ox} , b) A_{red1} , c) A_{red2} , d) A_{ox} -OH i A_{red2} -HCOO. Kolory krzywych oznaczają modele: M0 - granatowy, M0a - niebieski, M1 - zielony (ciemny), M1a - zielony (jasny), M3 - czerwony, M1-L i M3-L - kolorowe linie przerywane

Struktura A_{red2} -H jest trwałym wodorkiem niklu o konfiguracji elektronowej $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}\text{Ni}_p^{2+}\text{HNi}_d^{2+}$. Zależność aktywacji A_{ox} od wartości pH może być dodatkowym potwierdzeniem, że A_{red2} jest formą aktywną katalitycznie. Podobna struktura z protonem została zaproponowana na podstawie obliczeń DFT przez Lindahl'a i współpracowników [88] w cyklu katalitycznym klastra C należącego do CODH.

5.4 Potencjały redukcji

Zależność pierwszego (A_{ox}/A_{red1}) i drugiego (A_{red1}/A_{red2}) potencjału redukcji od stałej dielektrycznej ϵ dla modeli klastra A stosowanych w obliczeniach została zaprezentowana na Rysunku 5.13. Ogólny wniosek z analizy wykresów jest następujący: wraz ze wzrostem stałej dielektrycznej wartość obliczonych potencjałów redukcji staje się bardziej dodatnia do czego przyczynia się stabilizacja struktury przez większą polarność otoczenia.



Rysunek 5.13: Zależność pierwszego i drugiego potencjału redukcji od stałej dielektrycznej ϵ dla modeli klastra A stosowanych w obliczeniach

Wartości potencjałów redukcji E_0 [V, względem NHE] obliczone zgodnie ze wzorem 5.23 dla modeli klastrera A zestawiono w Tablicy 5.12. Z danych zawartych w Tablicy 5.12 wynika, że potencjały redukcji dla $\epsilon=4$ mają bardzo duże ujemne wartości, co jest kolejnym dowodem na to, iż nie nadaje się on do obliczeń właściwości redoksowych metaloenzymów [89–93].

Pierwszy potencjał redukcji (A_{ox}/A_{red1}) obliczony dla modeli M0 i M1 jest ujemny i niższy niż dla pozostałych modeli (wyjątek $\epsilon=80$), co wskazuje, że A_{ox} nie ulega redukcji w warunkach fizjologicznych gdzie biologiczne reduktory mają potencjał bardziej dodatni. Powiększenie modelu o fragmenty białka (model M2 i M3) powoduje, że potencjał ten staje się bardziej dodatni niż -0.5 V. Obecność reszt aminokwasowych powoduje podwyższenie wartości E_0 na skutek tworzenia się wiązań wodorowych z siarką reszt tiolowych kubanu i atomami tlenu w koordynacyjnym otoczeniu niklu. Porównując modele M2 i M3 widać, że oddziaływanie klastrera z arginina w modelu M3 nie powodują dużych zmian wartości E_0 (od 0.1 V do 0.2 V w zależności od ϵ). Fakt, że potencjały obliczone dla największego modelu M3 są bardziej dodatnie niż -0.5 V, a klaster A w formie spoczynkowej (A_{ox}) nie ulega redukcji, skłania żeby szukać innej przyczyny jego odporności na redukcję. W tym celu wyznaczono potencjały redukcji dla klastrera A związanego z ligandem mrówczanowym. Jest to jeden z ligandów, którego obecność jest proponowana w strukturze białka zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi [1]. Udział tego liganda rzeczywiście przesunął obliczone potencjały redukcji w kierunku niższych wartości i dla $\epsilon=20$ jest on równy -1.065 V. Należy zwrócić uwagę, że $\epsilon=20$ używany jest tu jako punkt odniesienia i jest to maksymalna wartość ϵ dla obliczeń w białku. Obliczenia dla $\epsilon=80$ przeprowadzono dla sprawdzenia jak wzrost wartości stałej dielektrycznej wpływa na potencjał redukcji oraz w celu znalezienia takiej stałej dielektrycznej, która daje podobne wartości E_0 dla modelu M0 jak dla modelu M3. Okazało się, że $\epsilon=80$ dla modelu M0a ma potencjały zbliżone od modelu M3 dla $\epsilon=20$. Fakt ten został wykorzystany podczas obliczeń dla reakcji metylacji.

Drugi potencjał redukcji (A_{red1}/A_{red2}) jest bardzo ujemny dla wszystkich rozpatrywanych w obliczeniach modeli. Dla stałej dielektrycznej $\epsilon=20$ (Tablica 5.12) dla modelu M3 wynosi on -1.052 V, a dla modelu M1a -1.661 V. Wartość -1.052 V jest znów bliska modelowi M0a dla $\epsilon=80$ (różnica wynosi około 0.1 V). Dla klastrera A z ligandem mrówczanowym drugi potencjał redukcji jest równy -1.384 V dla $\epsilon=20$.

W Tablicy 5.12 podane są wartości (A_{ox}/A_{red2}), które wykorzystano w obliczeniach dwuelektronowej redukcji połączonej z protonacją.

Zgodnie z danymi literaturowymi zaproponowano dwa mechanizmy sprzężonej z przyłączeniem protonu redukcji A_{ox} . Grahame i współpracownicy [19] sugerują dwie kolejne jednoelektronowe redukcje, w trakcie których przyłączenie protonu odbywa się w kroku pierwszym. Lindahl i współpracownicy [9] postu-

lują jedną dwuelektronową redukcję, której towarzyszy wychwyt protonu. Biorąc pod uwagę fakt, że A_{ox} posiada potencjał redukcji niższy niż -0.5 V, przyłączenie protonu powinno odbywać się w pierwszym kroku dwuetapowego procesu.

Tablica 5.13 zawiera obliczone, zależne od pH potencjały redukcji (E'_0) wyznaczone dla modeli M0 i M1 oraz modelu M1-L i M3-L z anionem mrówczanowym. Dla modeli M2 i M3 parametry te nie były wyznaczane, ponieważ obliczony pierwszy potencjał redukcji (A_{ox}/A_{red1}) jest bardziej dodatni niż wartość -0.5 V, co oznacza, że można je zredukować przy pomocy biologicznych reduktorów. Podane wartości zostały obliczone ze wzoru 5.24 i porównane z dostępnymi danymi eksperymentalnymi [19,57]. W niniejszej pracy wyznaczono zależności od pH dla dwuelektronowej redukcji połączonej z protonacją, na co wskazały wcześniejsze obliczenia pK_a . Dla jednoelektronowej redukcji połączonej z protonacją, protonacji musiałby ulegać A_{red1} a jak pokazały obliczenia pK_a , wartości dla tej struktury są małe, nie będzie on więc wiązał protonu. Dość dobrą zgodność wartości obliczonych z danymi doświadczalnymi uzyskano dla konformacji rozwartych modeli M0a i M1a ($\epsilon=80$, Tablica 5.13). Dla klastrera A z ligandem mrówczanowym (M3-L) wartości zależnych od pH potencjałów redukcji (E'_0) pozostają o około 0.4 V niższe od danych eksperymentalnych. Jednak za modelem tym przemawia kilka czynników: jest on najbardziej rozbudowany i wyjaśnia dlaczego forma utleniona klastrera A nie ulega redukcji, natomiast niezgodność wartości potencjałów redukcji obliczonych z doświadczalnymi może wynikać z faktu, że nie ma pewności czy ligandem związanym z Ni_p jest anion mrówczanowy [87] oraz należy wziąć pod uwagę błąd metody. Biorąc pod uwagę wszystkie rozważane aspekty wydaje się, że model klastrera A z przyłączonym ligandem, który ulega protonacji i dwuelektronowej redukcji jest najbardziej prawdopodobny.

Tablica 5.12: Wartości potencjałów redukcji E_0 [V, względem NHE] obliczone dla modeli klastra A. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 12, 20, 80$

$\epsilon=$	4	12	20	80	4	12	20	80	4	12	20	80
E_0	(A_{ox}/A_{red1})				(A_{red1}/A_{red2})				(A_{ox}/A_{red2})			
M0	-2.072	-	-0.813	-0.578	-3.224	-	-1.482	-1.144	-2.648	-	-1.148	-0.861
M0a	-1.740	-	-0.631	-0.387	-3.300	-	-1.562	-1.156	-2.520	-	-1.096	-0.771
M1	-1.609	-0.730	-0.553	-0.353	-2.872	-1.486	-1.195	-0.859	-2.241	-1.108	-0.874	-0.606
M1a	-1.755	-0.866	-0.688	-0.488	-3.309	-1.948	-1.661	-1.328	-2.532	-1.357	-1.174	-0.908
M2	-	-0.594	-0.453	-0.287	-	-1.227	-0.982	-0.699	-	-0.911	-0.717	-0.493
M3	-	-0.406	-0.324	-0.232	-	-1.155	-1.052	-0.849	-	-0.780	-0.688	-0.541
MetCbl ^{a)}	-	-	-	-	-1.065	-1.269	-1.308	-1.350	-	-	-	-
E_0	$(A_{ox}-HCOO/A_{red1}-HCOO)$				$(A_{red1}-HCOO/A_{red2}-HCOO)$				$(A_{ox}-HCOO/A_{red2}-HCOO)$			
M1-L	-1.652	-1.358	-1.021	-	-2.294	-1.930	-1.467	-	-1.973	-1.644	-	-1.244
M3-L	-1.216	-1.065	-0.839	-	-1.987	-1.384	-1.045	-	-1.602	-1.224	-	-0.942

^{a)} MetCbl = metylokobaltokoryna (metylokobalamina)

Tablica 5.13: Zależność wartości obliczonych potencjałów redukcji E° od pH. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 12, 20, 80$

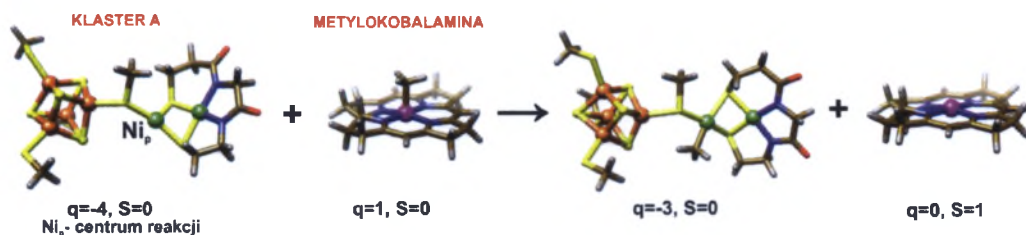
$\epsilon=$	4	12	20	80	4	12	20	80	Exp. ^{a)}	Exp. ^{b)}	
E°	$(A_{ox}/A_{red2}-NiH)$										
	M0				M0a						
pH=6.5	-1.298	-	-0.708	-0.600	-1.077	-	-0.522	-0.641	-0.479	-0.463	
pH=7.2	-1.319	-	-0.729	-0.620	-1.098	-	-0.543	-0.641	-0.495	-0.490	
pH=7.9	-1.339	-	-0.750	-0.641	-1.119	-	-0.564	-0.403	-0.524	-0.547	
	M1				M1a						
pH=6.5	-1.687	-0.629	-0.552	-0.441	-2.008	-0.629	-0.551	-0.443			
pH=7.2	-1.708	-0.650	-0.572	-0.461	-2.029	-0.650	-0.571	-0.464			
pH=7.9	-1.728	-0.670	-0.593	-0.482	-2.050	-0.670	-0.592	-0.485			
E°	$(A_{ox}-HCOO/A_{red2}-NiH-HCOO)$										
	M1-L				M3-L						
pH=6.5	-0.961	-1.050	-0.874		-0.960	-0.861	-0.782				
pH=7.2	-0.982	-1.070	-0.895		-0.981	-0.881	-0.803				
pH=7.9	-1.002	-1.091	-0.916		-1.001	-0.902	-0.824				

^{a)} Odnosznik [57], ^{b)} Odnosznik [19]

5.5 Reakcja metylacji

Drugim ważnym elementem badań teoretycznych były obliczenia mające na celu wskazanie mechanizmu reakcji metylacji klastera A. Aby możliwe było prawidłowe opisanie mechanizmu reakcji stosowana metodyka obliczeń musi poprawnie odtwarzać potencjały redukcji reagentów, a wyniki zostały przedstawione w Rozdziale 5.4. Syntaza acetylokoenzymu A (ACS) katalizuje reakcję powstawania acetylokoenzymu A z koenzymu A (CoASH), tlenku węgla powstającego w klasterze C i metylu przenieszonego przez białko koryna-żelazo-siarkowe (Co-FeSP) zgodnie z równaniem *reakcji 2* (Rozdział 3, strona 21). W białku Co-FeSP metylokobalamina występuje w formie "base-off". Szczegółowy mechanizm przedstawionej reakcji pozostaje nadal przedmiotem dyskusji [7, 57, 64, 86]. Reakcja metylacji jest jednym z etapów pośrednich tego procesu.

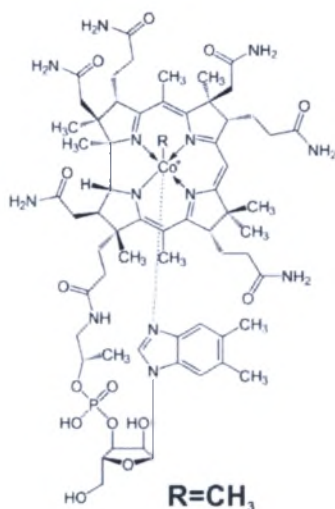
5.5.1 Model strukturalny



Rysunek 5.14: Schemat reakcji metylacji z uwzględnieniem struktur modelowych stosowanych w obliczeniach

W niniejszej pracy wykonano obliczenia dla reakcji przeniesienia metylu z metylokobalaminy (metylokobaltokoryny) na klaster A z użyciem małego modelu M0a. Model ten został wybrany ze względu na czasochłonność obliczeń, a jak pokazano w poprzednim podrozdziale jego właściwości redoksove w $\epsilon=80$ są porównywalne z modelem M3 dla $\epsilon=20$. Schemat reakcji metylacji z uwzględnieniem struktur modelowych został pokazany na Rysunku 5.14. Czynnikiem metylującym była metylokobalamina (metylokobaltokoryna) w formie "base-off" (struktura bez liganda dimetylobenzoimidazolowego) przedstawiona na Rysunku 5.15. Potencjał redukcji metylokobalaminy modelującej białko CoFeSP, zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi jest równy -1.21 V [94] (wartość eksperymentalna), oraz -1.35 V (wynik otrzymany w metodzie DFT/BP86 dla formy "base

off”), a energia dysocjacji grupy metylowej w zredukowanej metylkobalaminie wynosi 19 kcal [95, 96].

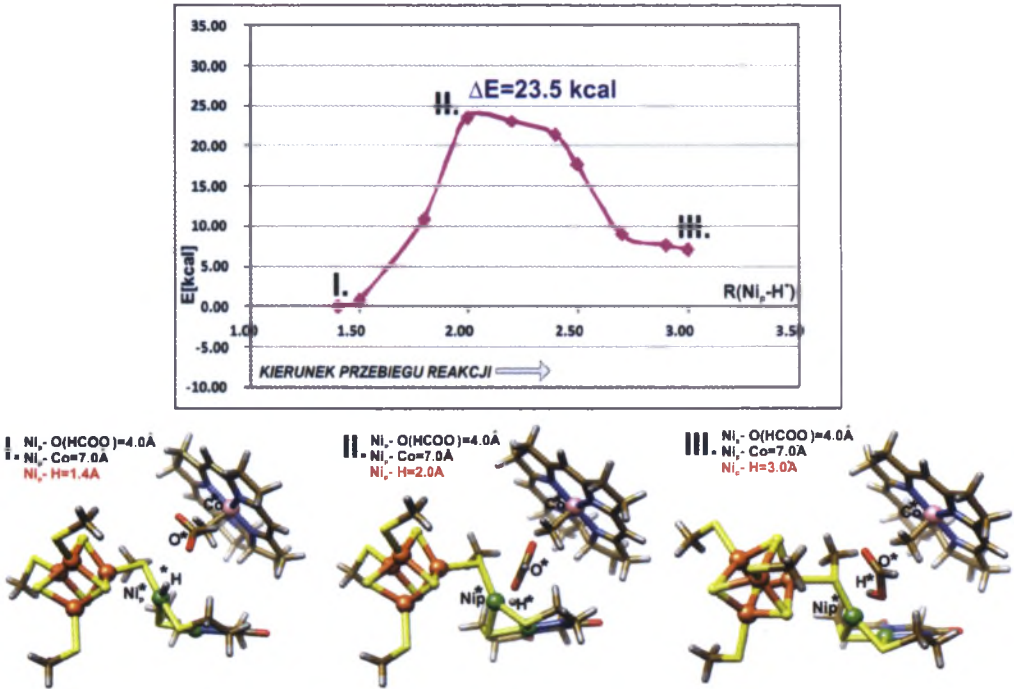


Rysunek 5.15: Metylokobalamina (metylokobaltokoryna) w formie "base-on" z ligandem dimetylobenzoimidazolowym. Odnośnik [97]. W obliczeniach zastosowano model strukturalny w formie "base-off" (struktura z odłączonym ligandem aksjalnym DMB)

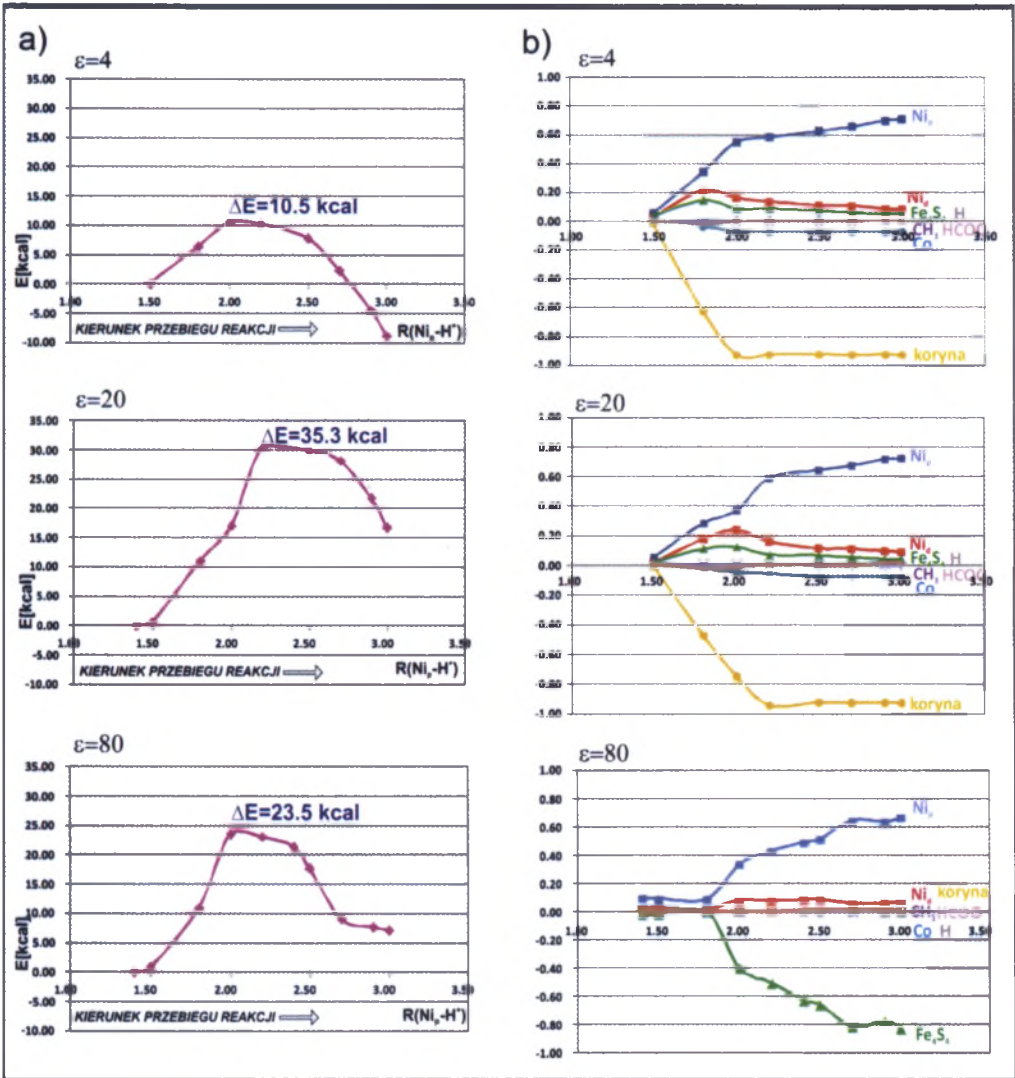
5.5.2 Reakcja deprotonacji

Aby nastąpiła metylacja klastra A musi on ulec redukcji. Doświadczalnie pokazano, że towarzyszy temu protonacja (redukcja jest zależna od pH) [19, 57]. Obiektem kontrowersji jest, czy jest to proces dwuetapowy (jednoelektronowa redukcja + protonacja i kolejna redukcja) czy jednoetapowy (dwuelektronowa redukcja + protonacja). Obliczenia opisane w Rozdziale 5.4 wskazują na proces jednoetapowy z protonacją na Ni_p . Oznacza to, że przed lub w trakcie metylacji proton musi opuścić klaster A, a w reakcji najprawdopodobniej uczestniczy cząsteczka zasady. W prezentowanej pracy wykonano obliczenia dla deprotonacji przyjmując jako zasadę jon mrówczanowy ($HCOO^-$). Profil energii procesu oderwania protonu przez anion mrówczanowy jako funkcja odległości protonu od Ni_p , wraz z zaznaczonymi strukturami substratów (I.), produktów (III.) i stanu przejściowego (II.) został przedstawiony na Rysunku 5.16. Krzywe energii reakcji oderwania protonu dla różnych stałych dielektrycznych $\epsilon = 4, 20$ i 80 oraz wykresy zmian gęstości spinowych na wybranych fragmentach klastra A i $HCOO^-$ zademonstrowano na Rysunku 5.17 [panel a) i panel b)]. Podana na Rysunku 5.16 [panel a)] bariera energetyczna rozpatrywanej reakcji dla $\epsilon=80$ wynosi 23,5 kcal,

a zgodnie z różnicą energii substratów (I.) i produktów (III.) reakcja jest endotermiczna.



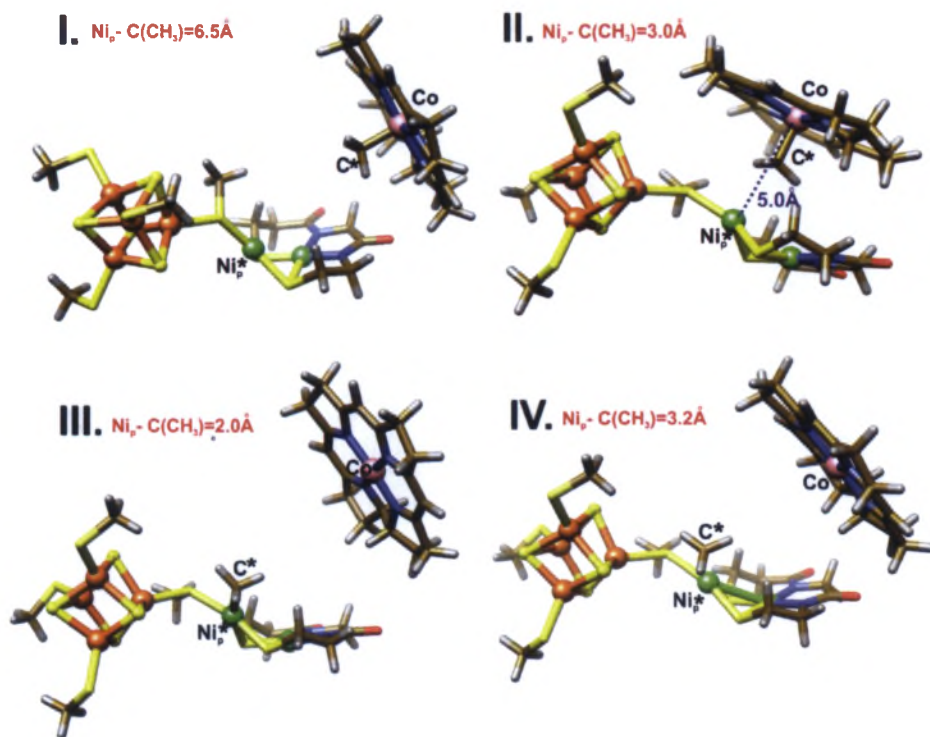
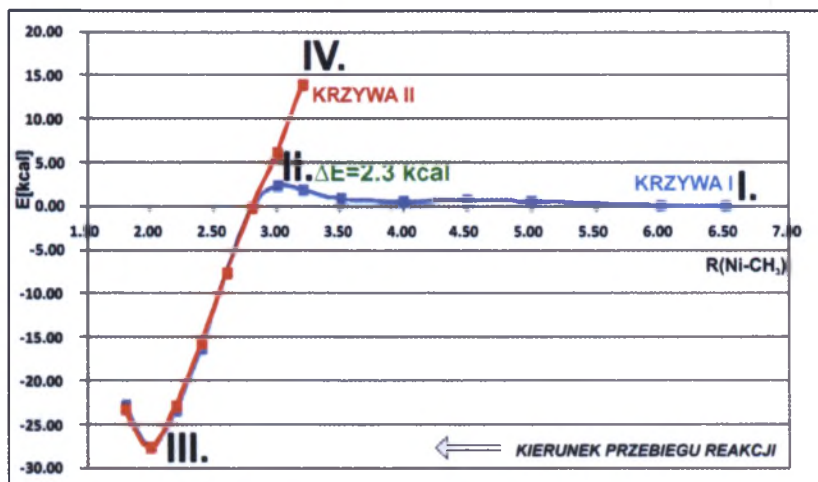
Rysunek 5.16: Krzywa energii jako funkcja odległości $\text{Ni}_p\text{-H}^+$ dla reakcji oderwania protonu przez anion mrówczanowy z zaznaczonymi strukturami substratów (I.), produktów (III.) i stanu przejściowego (II.). Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=80$. Położenia atomów zaznaczonych gwiazdką zostały zamrożone w trakcie optymalizacji



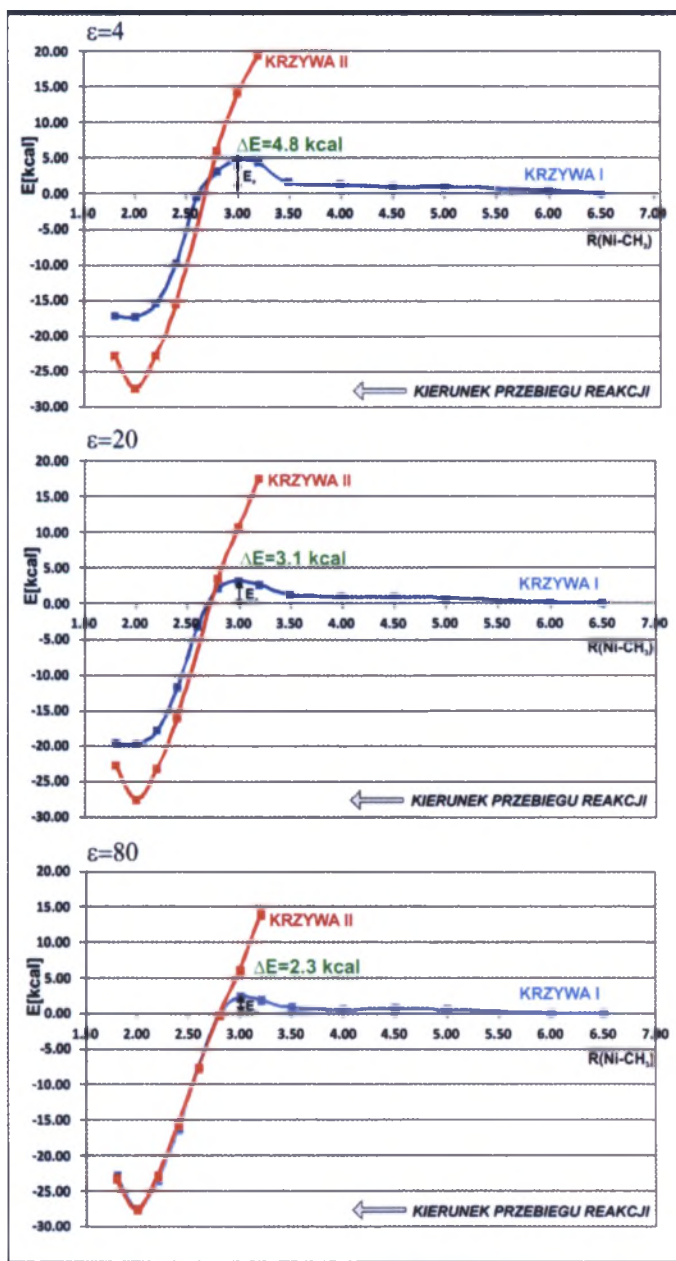
Rysunek 5.17: Panel a) krzywe energii jako funkcje odległości $\text{Ni}_p\text{-H}^+$ dla reakcji odcierania protonu przez anion mrówczanowy dla różnych stałych dielektrycznych ϵ ; panel b) zmiana gęstości spinowych na fragmentach klastra A i anionie mrówczanowym w trakcie reakcji przeniesienia protonu. Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 20$ i 80

5.5.3 Mechanizm A

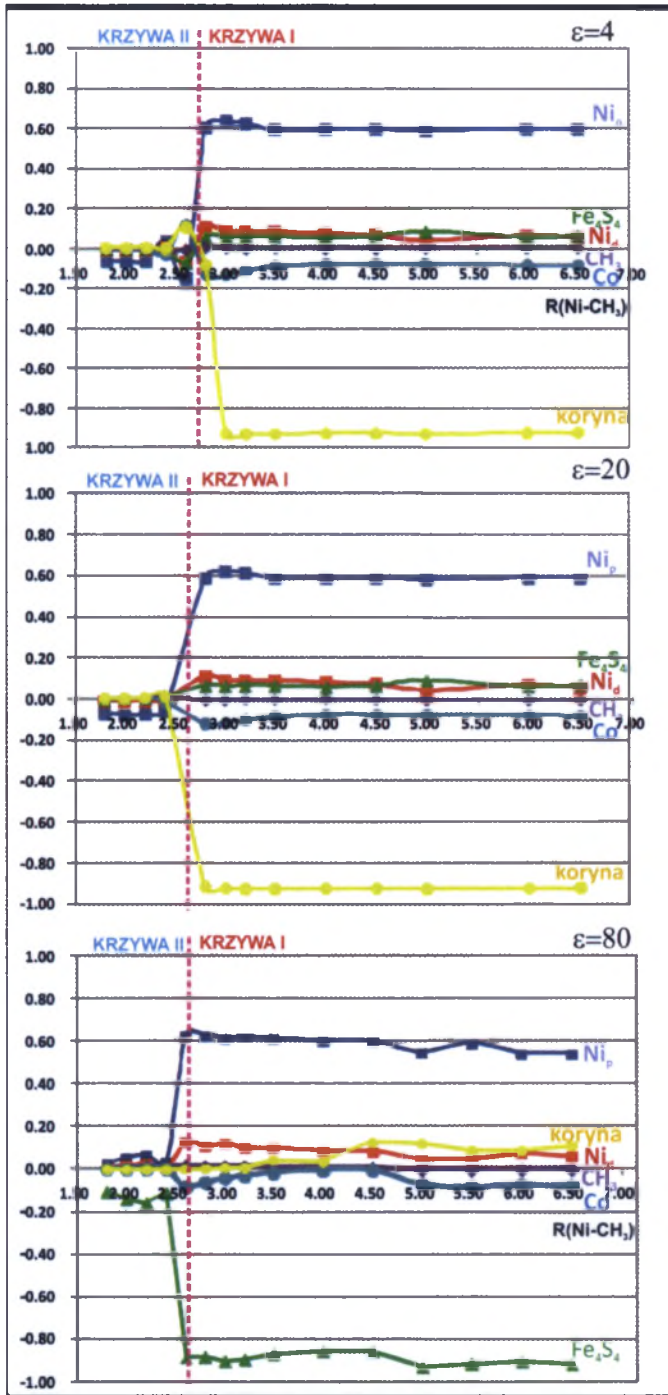
W kolejnym etapie badań teoretycznych, nad mechanizmem metylacji obliczono energię jako funkcję odległości Ni_p-CH_3 . W obliczeniach użyto formy dwuelektronowo zredukowanej klastera A, zgodnie z wcześniej przeprowadzonymi obliczeniami, w których protonacji towarzyszy dwuelektronowa redukcja. Na Rysunku 5.18 przedstawiono profil energetyczny reakcji przeniesienia metylu z metylokobaltokoryny na klaster A, natomiast na Rysunku 5.19 pokazano przebieg krzywych energii dla różnych stałych dielektrycznych ($\epsilon=4, 20$ i 80). Jak pokazuje Rysunek 5.19, w zależności od startowej geometrii użytej do obliczeń otrzymano dwie krzywe energii. Jeżeli punktem wyjścia były małe odległości Ni_p-CH_3 uzyskiwano KRZYWA II, natomiast rozpoczynając obliczenia od dużych odległości Ni_p-CH_3 i używając otrzymanej geometrii jako start dla kolejnego punktu otrzymano KRZYWA I. Na KRZYWEJ I odległość $Co-CH_3$ jest równa około 2 \AA , natomiast na KRZYWEJ II kobaltokoryna jest zdysocjowana. KRZYWA II opisuje dysocjację metylu z klastera A. Obie krzywe przecinają się przy odległości Ni_p-CH_3 równej 2.6 \AA . Należy zwrócić uwagę, iż punkt przecięcia odpowiada innym geometriom na poszczególnych krzywych. Dla odległości $Ni_p-CH_3=3 \text{ \AA}$, niezależnie od ϵ otrzymano maksima na KRZYWEJ I. Bariera reakcji maleje w zależności od stałej dielektrycznej i wynosi odpowiednio 4.8 kcal ($\epsilon=4$), 3.1 kcal ($\epsilon=20$) oraz 2.3 kcal ($\epsilon=80$). Na Rysunku 5.20 przedstawiono zmiany gęstości spinowych na wybranych fragmentach klastera A, metylu i na kobaltokorynie wzdłuż ścieżki reakcji o najniższej energii (KRZYWA II w zakresie $Ni_p-CH_3=1.4-2.6 \text{ \AA}$ oraz KRZYWA I w zakresie $Ni_p-CH_3=2.6-6.5 \text{ \AA}$). Zmiany gęstości spinowych na korynie pokazują, że dla $\epsilon=4$ i 20 ulega ona redukcji. Nie redukuje się natomiast dla $\epsilon=80$, a klaster A wykazuje sprzężenie antyferromagnetyczne ($[Fe_4S_4]-Ni_p$). Przebieg reakcji nie zależy silnie od stałej dielektrycznej ϵ , ani od tego czy koryna jest zredukowana, a wskazana reakcja jest silnie egzotermiczna, około 27 kcal . Należy zwrócić uwagę na fakt, że grupa metylowa posiada małą gęstość spinową, która nie zmienia się w trakcie przebiegu reakcji, mechanizm można więc określić jako S_N2 .



Rysunek 5.18: Krzywa energii jako funkcja odległości Ni_p-CH_3 dla reakcji przeniesienia metylu z metylokobaltokorony na cluster A z zaznaczonymi strukturami substratów (I., IV.), produktów (III.) i stanu przejściowego (II.). Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=80$. Położenia atomów zaznaczonych gwiazdką zostały zamrożone w trakcie optymalizacji. $\Delta E = E(I.) - E(III.) = 27 \text{ kcal}$



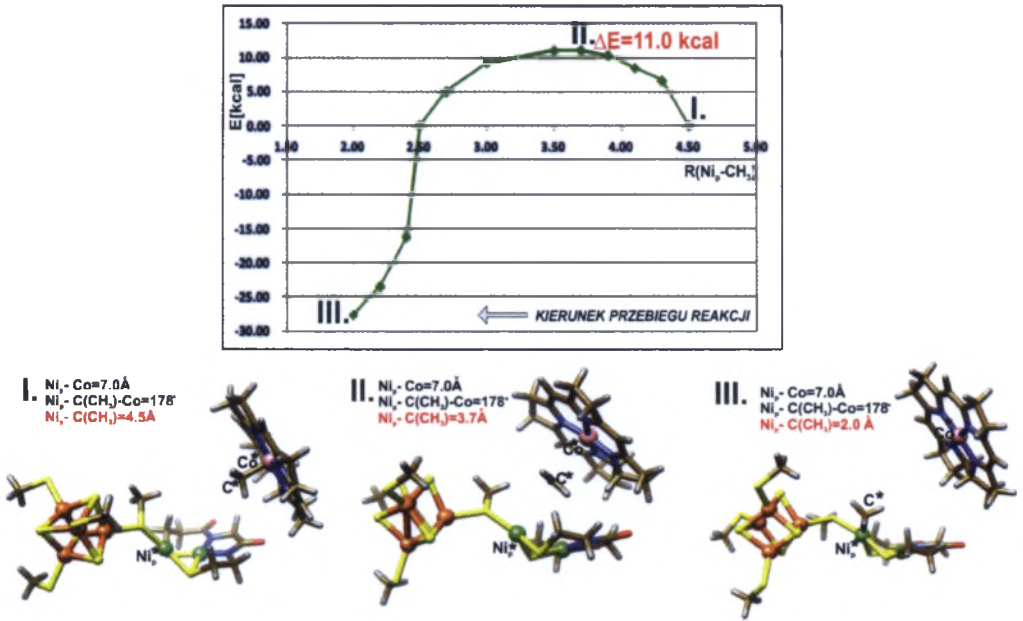
Rysunek 5.19: Krzywe energii jako funkcje odległości $\text{Ni}_p\text{-CH}_3$ dla reakcji przeniesienia metylu z metylokobaltokorony na cluster A dla różnych stałych dielektrycznych ϵ . Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 20$ i 80 . Wzdłuż KRZYWEJ I odległość Co-CH_3 utrzymuje stałą wartość ok. 2 \AA . Wzdłuż KRZYWEJ II, opisującej dysocjację metylu z clustera A, kobaltokorona jest oderwana i znajduje się w pewnej odległości od reszty układu



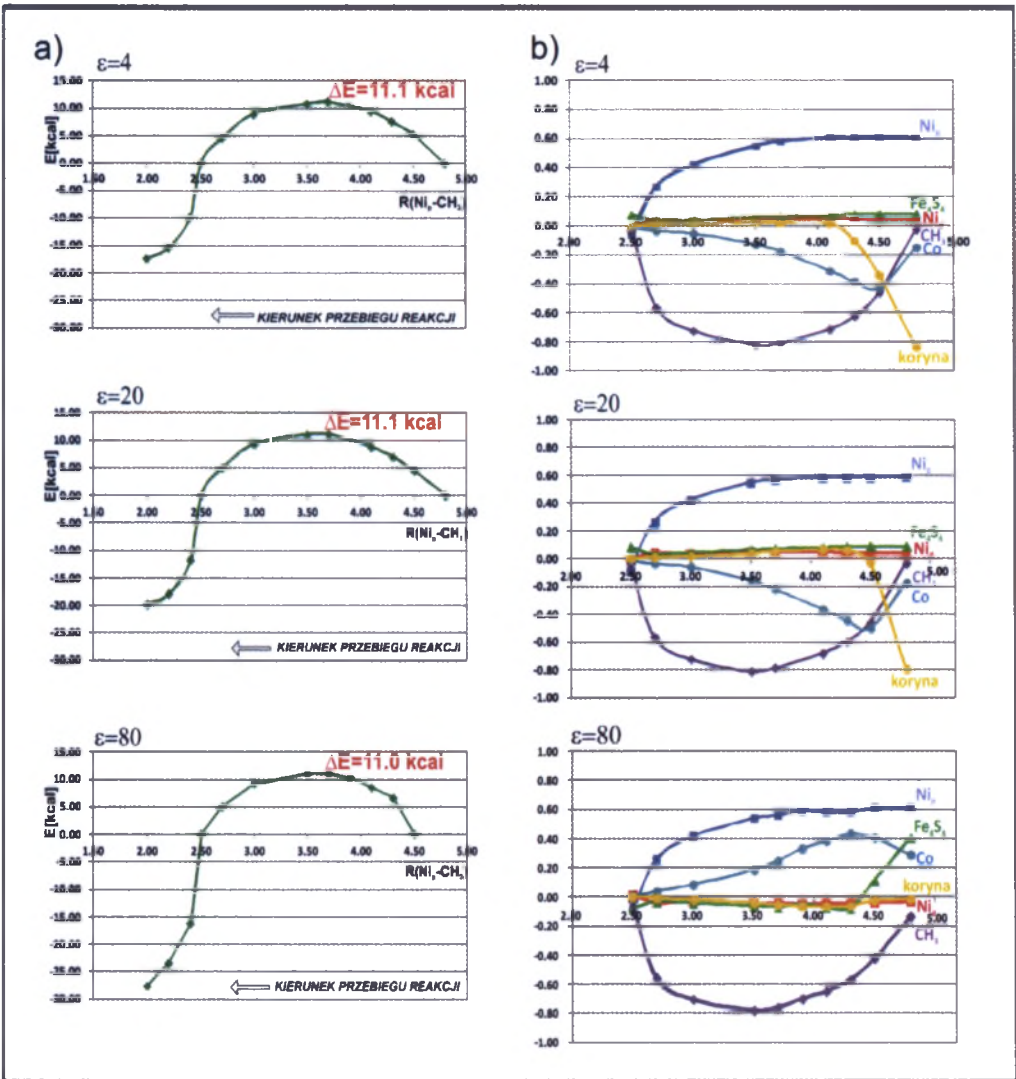
Rysunek 5.20: Zmiana gęstości spinowych na fragmentach klastru A, metylu i kobaltokorynie wzdłuż ścieżki reakcji o najniższej energii. Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 20$ i 80

5.5.4 Mechanizm B

Ponieważ zbliżanie CoFeSP do modułu białka zawierającego klaster A jest związane z przeszkodą steryczną wymaga ono dużych zmian konformacyjnych [50]. W kolejnym etapie badań teoretycznych nad mechanizmem reakcji metylacji sprawdzono jaki mechanizm mógłby wchodzić w grę, gdyby dwa centra metaliczne Ni_p i Co nie mogły się zbliżyć na małą odległość. Aby to zweryfikować zamrożono odległość Ni_p -Co na 7 Å i zmieniano położenie grupy $-CH_3$, przemieszczając ją od atomu kobaltu do niklu. Taki model reakcji odpowiadał by mechanizmowi rodnikowemu z przeniesieniem elektronu. Na Rysunku 5.21 zaprezentowano profil energetyczny reakcji dla $\epsilon=80$ wraz z zaznaczonymi strukturami substratów (I.), produktów (III.) i stanu przejściowego (II.). Przebieg krzywych energii reakcji przeniesienia metylu dla trzech stałych dielektrycznych ($\epsilon=4$, 20 i 80) oraz odpowiadające im zmiany gęstości spinowych na wybranych fragmentach klastra A, metylu i na kobaltokorynie pokazano na Rysunku 5.22. W trakcie przenoszenia grupy $-CH_3$ z kobaltu na nikiel, Co i Ni_p uzyskują duże gęstości spinowe. Dużą gęstość spinową posiada też grupa metylowa, dlatego opisywany mechanizm odpowiada mechanizmowi rodnikowemu. Bariera reakcji, która występuje przy odległości Ni_p - $CH_3=7$ Å wynosi około 11 kcal i nie zależy od stałej dielektrycznej ϵ . Wpływ stałej dielektrycznej można natomiast zauważyć dla zmian gęstości spinowych na korynie. Dla $\epsilon=4$ i 20, początkowo ulega ona redukcji natomiast przy odległości równej ~ 4.0 Å elektron przenosi się na kuban żelazo-siarkowy [Fe_4S_4]. Dla $\epsilon=80$ nie obserwujemy redukcji koryny, a przy odległości Ni_p - CH_3 równej ~ 4.5 Å elektron z kubanu [Fe_4S_4] jest przenoszony na kobalt. W efekcie redukcja następuje nie na początku reakcji metylacji ale w jej trakcie.



Rysunek 5.21: Krzywa energii jako funkcja odległości $\text{Ni}_p\text{-CH}_3$ dla reakcji przeniesienia metylu pomiędzy atomem Ni_p klastra A a metylokobaltokoryną przy stałej odległości $\text{Co-Ni}_p=7\text{\AA}$ z zaznaczonymi strukturami substratów (I.), produktów (III.) i stanu przejściowego (II.). Sytuacja taka modeluje reakcję rodnikową z przeniesieniem elektronu (ET). Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu $\text{PCM}/\epsilon=80$. Położenia atomów zaznaczonych gwiazdką zostały zamrożone w trakcie optymalizacji



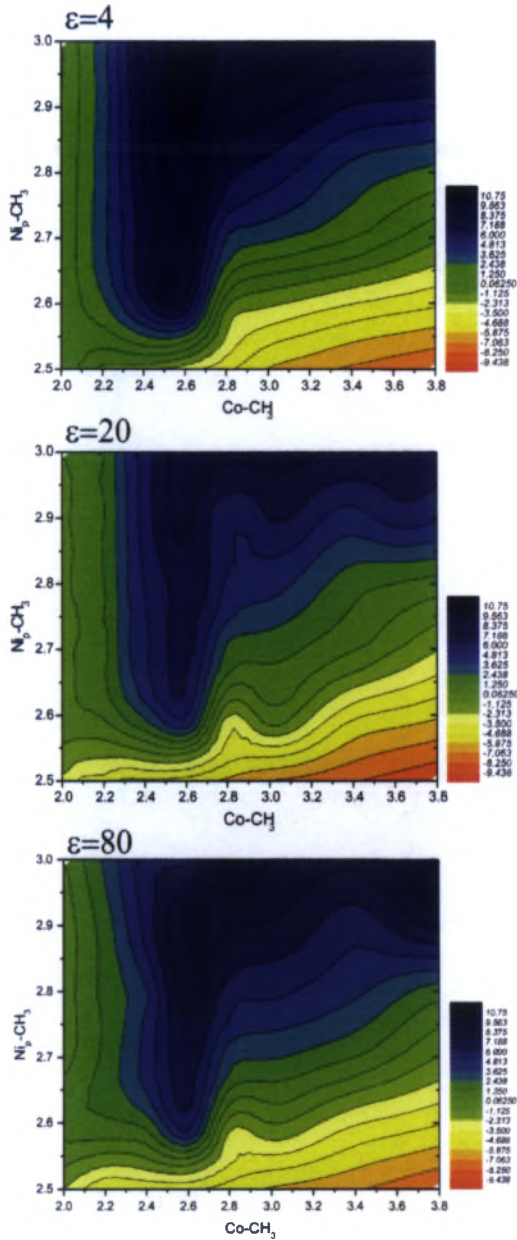
Rysunek 5.22: Panel a) Krzywa energii reakcji przeniesienia metylu pomiędzy atomem Ni_p klastra A a metylokobaltokoryną przy ustalonej odległości $\text{Co}-\text{Ni}_p=7$ Å. Sytuacja taka modeluje reakcję rodnikową z przeniesieniem elektronu (ET); panel b) Zmiana gęstości spinowych na fragmentach klastra A, metylu i kobaltokorynie. Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 20$ i 80

5.5.5 S_N2 czy reakcja rodnikowa

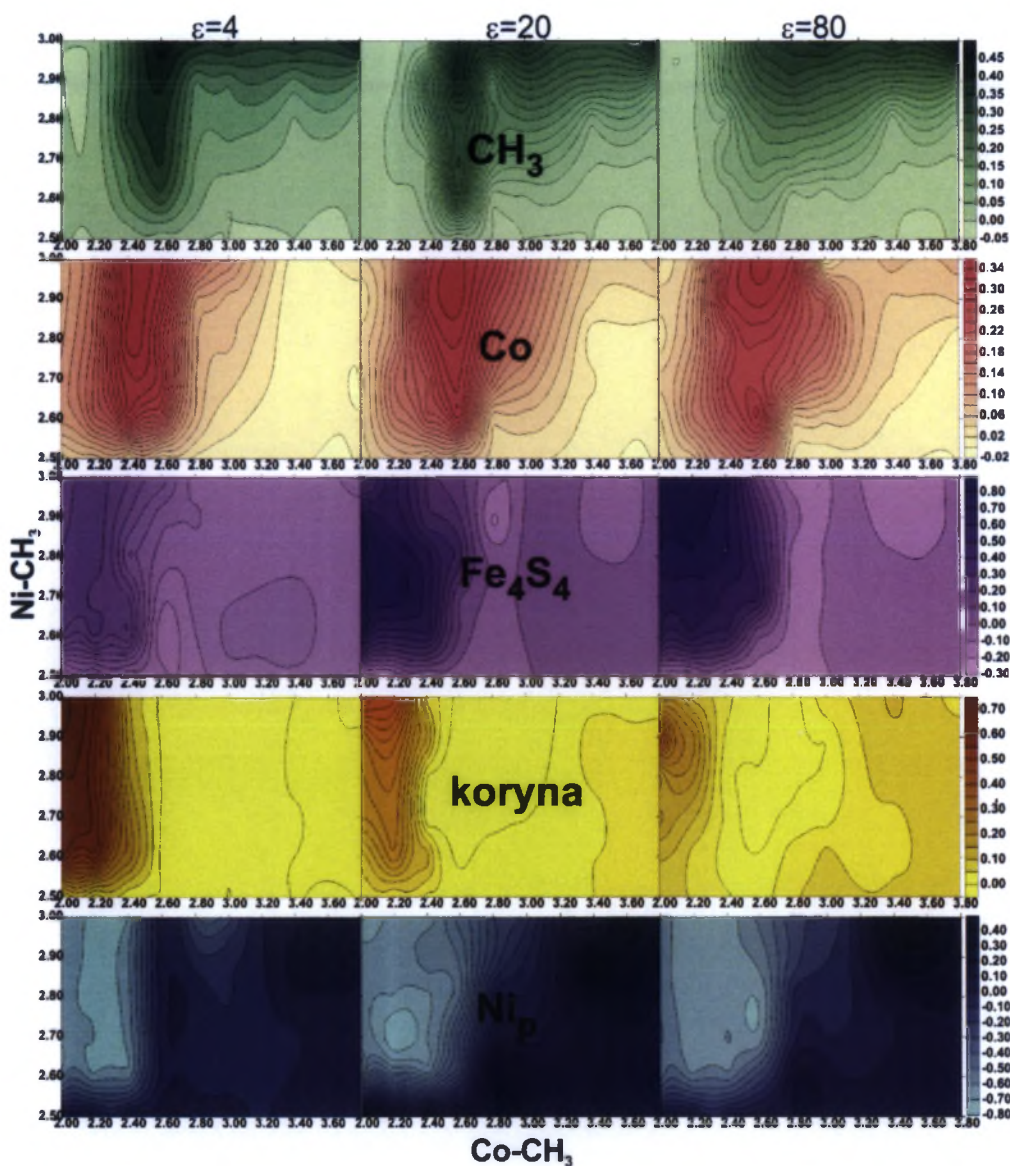
W Podrozdziale 5.5.3 na Rysunku 5.19 pokazano, że KRZYWE I i II przecinają się przy odległości Ni_p-CH_3 równej około 2.6 Å, a geometria w tym punkcie dla obu krzywych jest inna (dla KRZYWEJ II kobaltokoryna jest odłączona od klastera A). Nasuwa się więc pytanie, jaka jest bariera przejścia między jedną a drugą geometrią w punkcie przecięcia krzywych. Aby to zweryfikować wykonano obliczenia powierzchni energii w zależności od dwóch parametrów, odległości $Ni_p-CH_3=2.5-3.0$ Å oraz odległości $Co-CH_3=2.0-3.0$ Å dla różnych stałych dielektrycznych ϵ . Wyniki tych obliczeń prezentuje Rysunek 5.23. Powierzchnie gęstości spinowych na fragmentach klastera A, metylu i kobaltokorynie w zakresie tych samych odległości, dla różnych stałych dielektrycznych ϵ pokazano na Rysunku 5.24.

Wykresy powierzchni energii potencjalnej mają podobny przebieg dla wszystkich uwzględnionych wartości ϵ . Lewy, górny róg wykresów odpowiada stanowi przejściowemu w opisywanym MECHANIZMI A (Rysunek 5.19, Podrozdział 5.5.3). Wysokim wartościom energii (Rysunku 5.23), odpowiadają duże gęstości spinowe dla Co i CH_3 na (Rysunku 5.24). Dla atomu Ni_p do odległości $Co-CH_3-2.6$ Å gęstości spinowe są niewielkie. Zupełnie inny przebieg wykresów można zaobserwować dla koryny. Dla $\epsilon=4$ obserwujemy dużą gęstość spinową do odległości $Co-CH_3=2.40$ Å, która zmniejsza się dla $\epsilon=20$ i prawie całkowicie zanika dla $\epsilon=80$. Tak więc dla środowiska mniej polarnego transferowi metylu towarzyszy w pierwszym etapie przeniesienie elektronu (ET). Redukcja metylo-kobalaminy nie ma większego wpływu na energetykę reakcji S_N2 oraz reakcji rodnikowej (Rysunek 5.23).

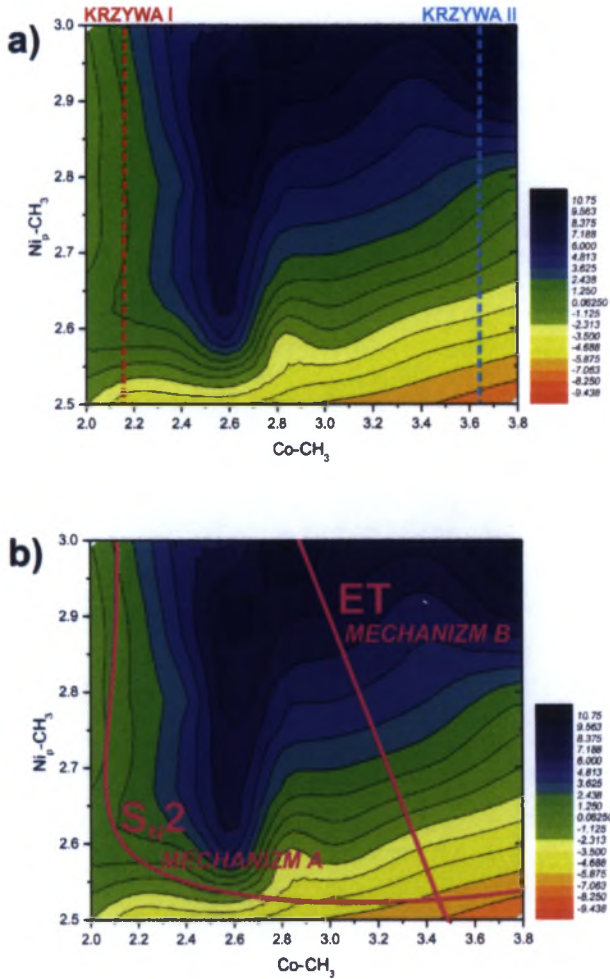
Zaznaczona na Rysunku 5.25 [panel a)] ścieżka reakcji, początkowo równoległa do osi pionowej (Ni_p-CH_3) a potem poziomej ($Co-CH_3$), odpowiada reakcji S_N2 (MECHANIZM A). Natomiast ścieżka ukośna wyznacza reakcję rodnikową (MECHANIZM B). Mechanizm rodnikowy ma wyższą barierę, a bariera ta zależy od odległości Ni_p-Co . W mechanizmie S_N2 dwa centra metaliczne muszą się zbliżyć na odległość około 4.5 Å. Jeżeli z uwagi na występowanie przeszkody sterycznej zbliżenie odpowiednich modułów białka staje się niemożliwe, to przynajmniej częściowo reakcja mogłaby przebiegać według mechanizmu rodnikowego. Z drugiej strony jak pokazano w pracy [98], w reakcji metylacji kobalaminy przez metylotetrahydrofolan centra reakcji mogą się zbliżyć na bardzo małą odległość, co w zasadzie przemawia za reakcją S_N2 .



Rysunek 5.23: Powierzchnie energii potencjalnej zależne od dwóch parametrów geometrycznych, odległości $\text{Ni}_p-\text{CH}_3=2.5\text{--}3.0 \text{ \AA}$ oraz odległości $\text{Co}-\text{CH}_3=2.0\text{--}3.0 \text{ \AA}$ dla różnych stałych dielektrycznych ϵ . Obszar ten modeluje przejście pomiędzy KRZYWYMI I i II (Rysunek 5.19.). Lewy górny róg odpowiada energii stanu przejściowego reakcji metylacji. Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 20$ i 80



Rysunek 5.24: Powierzchnie gęstości spinowych na fragmentach klastru A, na metylu i na kobaltokorynie dla dwóch odległości $\text{Ni}_p\text{-CH}_3=2.5\text{--}3.0$ Å oraz $\text{Co-CH}_3=2.0\text{--}3.0$ Å i różnych stałych dielektrycznych ϵ . Wyniki otrzymano metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 20$ i 80

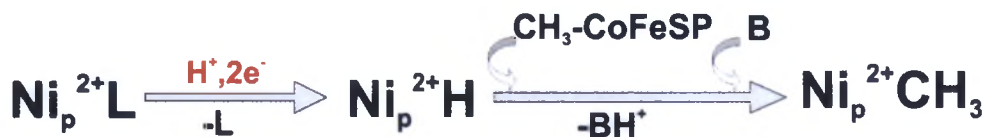


Rysunek 5.25: Panel a) wzajemna położenie KRZYWEJ I i II dla dwóch odległości $Ni_p-CH_3=2.5-3.0$ Å oraz $Co-CH_3=2.0-3.0$ Å; panel b) ścieżki reakcji odpowiedzialne za MECHANIZM A i MECHANIZM B. Zaznaczona ścieżka dotyczy odległości $Ni_p-Co=6$ Å

5.5.6 Redukcyjna metylacja klastrera A przez metylokobalaminę

W początkowym studium badań, w oparciu o model M1 został zaproponowany mechanizm dwuelektronowej redukcji klastrera A z udziałem i przeniesieniem elektronu na metylokobalaminę [80]. Drugi potencjał redukcji (A_{red1}/A_{red2}) obliczony dla modelu M1a jest równy -1.661 V ($\epsilon=20$, Tablica 5.12). Klaster A mógłby więc zredukować metylokobalaminę w formie "base-off", dla której obliczony w tym rozpuszczalniku potencjał redukcji wynosi -1.308 V. Porównując potencjały otrzymane dla największego modelu M3 (-1.052 V, $\epsilon=20$, Tablica 5.12) i metylokobalaminy, redukcja metylokobalaminy staje pod znakiem zapytania. Potencjały te są jednak dość zbliżone, biorąc więc pod uwagę dokładność metody obliczeniowej (0.2 V) oraz to, że doświadczalny potencjał redukcji metylokobalaminy w formie "base-off" wynosi -1.21 V [94] nie można całkowicie wykluczyć takiej redukcji. Obliczenia dla modelu M0, dla reakcji metylacji (zakładamy, że parametry modelu M0a w rozpuszczalniku o $\epsilon=80$ są referencyjne dla modelu M3 w rozpuszczalniku $\epsilon=20$, Tablica 5.12) również wskazują na brak redukcji. Jednak nadal te same argumenty mogą zostać przytoczone celem wyjaśnienia. Analizując te porównania można stwierdzić, że nie ma pewności czy redukcja faktycznie ma miejsce, jednak jak pokazały obliczenia nie ma ona większego wpływu na energetykę reakcji. Z drugiej strony wydaje się, że korzystniejszym mechanizmem reakcji jest mechanizm S_N2 niż mechanizm rodnikowy. Częściowy udział mechanizmu rodnikowego może następować przy utrudnionym dostępie dwóch metalicznych centrów reakcji. Energetyczny koszt tego procesu nie musi być duży - przy odległości $Ni_p-CH_3=2.6 \text{ \AA}$ przejście pomiędzy KRZYWĄ I i II na drodze rodnikowej ma barierę około 4 kcal.

Wyniki obliczeń przedstawione w niniejszej pracy pozwalają na zaproponowanie mechanizmu reakcji pokazanego na Rysunku 5.26.



Rysunek 5.26: Proponowany schemat reakcji metylacji klastrera A

Lindahl [99] zaproponował, że protonacja ma miejsce na anionie OH^- połączonym z proksymalnym atomem niklu (Ni_p). Wartości pK_a obliczone dla tego układu wskazują jednak, że w neutralnym pH ulega on protonacji. Za udziałem protonowanego klastrera A w reakcji metylacji przemawiają następujące argumenty. Wiązanie protonu powoduje, że klaster A nie ulega niepożądanym reakcjom ubocznym (zwłaszcza utlenieniu) zanim nastąpi metylacja. Przedstawione

w pracy wyniki obliczeń pokazują, że reakcja metylacji jest silnie egzotermiczna (Rysunek 5.19), co nie zgadza się z doświadczeniem. Badania kinetyki reakcji metylacji [99,99] wskazują, że reakcja jest prawie termoneutralna, jej bariera wynosi 8.3 kcal, a energia reakcji około 1 kcal. Obliczona w pracy wartość energii reakcji metylacji wynosi około 27 kcal. Wyjaśnieniem tak dużej różnicy pomiędzy obliczoną i zmierzoną energią reakcji może być koszt energetyczny deprotonacji. Klaster A w zredukowanej formie posiada wysokie pK_a (Tablica 5.11) co powoduje, że oderwanie protonu przez zasadę jest reakcją silnie endotermiczną [50].

W reakcji rodnikowej, w trakcie której metyl przenoszony jest w formie rodnika, elektron musi być dostarczony na kobaltokorynę na początku lub w trakcie reakcji metylacji, w zależności od relacji potencjałów redukcji reagentów, a tym samym także w zależności od stałej dielektrycznej ϵ . W reakcji S_N2 , jeżeli nastąpi przeniesienie elektronu (tak jak dla $\epsilon=4$ i 20), to po utworzeniu wiązania Ni_p-CH_3 elektron powraca na klaster A. Ten mechanizm można by określić jako mechanizm z przeniesieniem elektronu (ET).

6 Podsumowanie i wnioski

Obiektem badań teoretycznych, wchodzących w zakres prezentowanej pracy doktorskiej jest dwucentrowy kompleks niklu, $[\text{Fe}_4\text{S}_4]\text{-Ni}_p\text{Ni}_d$, nazywany klastrerem A. Stanowi on centrum aktywne syntazy acetylokoenzymu A (ACS), enzymu który katalizuje reakcje powstawania acetylokoenzymu A z CO, CH_3 i koenzymu A (CoASH) w bakteriach: *Moorella thermoacetica* i *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*.

W niniejszej pracy, do obliczeń teoretycznych zastosowano metodę funkcjonałów gęstości (DFT/BP86) oraz ciągły model rozpuszczalnika (PCM/ $\epsilon=4, 12, 20, 80$). Dla czterech typów modeli strukturalnych klastrera A, różniących się wielkością, przeprowadzono optymalizację geometrii na trzech stopniach utlenienia A_{ox} , A_{red1} i A_{red2} . Podobne obliczenia wykonano dla struktur protonowanych oraz dla klastrera A z ligandami ważnymi w cyklu katalitycznym enzymu. Wszystkie przypadki modeli uwzględniały obecność w strukturze cząsteczki wody, która zgodnie z danymi krystalograficznymi może występować jako ligand nieorganiczny skoordynowany z atomem Ni_p . Na podstawie przeprowadzonych obliczeń wyznaczono wartości pK_a i potencjały redukcji (E_0) oraz oceniono wpływ wielkości modelu strukturalnego i otoczenia białkowego na właściwości redoksove klastrera A. Następnie zgodnie z uzyskanymi wynikami zaproponowano mechanizm redukcyjnej aktywacji utlenionej formy klastrera A (A_{ox}).

Drugim ważnym elementem badań teoretycznych, składającym się na końcowy rezultat pracy, było wyznaczenie ścieżki reakcji metylacji klastrera A oraz wskazanie jej mechanizmu. Czynnikiem metylującym w reakcji była metylokoobalamina w formie "base-off" (struktura z odłączonym dolnym ligandem aksjalnym DMB). Reakcja ta, jest jednym z etapów pośrednich katalizowanej przez centrum aktywne reakcji powstawania acetylokoenzymu A.

Najważniejsze wnioski wynikające z pracy można sformułować następująco:

- Porównanie otrzymanych zoptymalizowanych wartości parametrów geometrycznych klastrera A z danymi doświadczalnymi pokazuje, że przyjęta metodyka obliczeń (metoda DFT/BP86 w bazie TZVP, $\epsilon=20$ dla modelu

M3) pozwala na poprawne modelowanie geometrii klastrera A, a sama geometria zależy silnie od przyjętego modelu strukturalnego, natomiast wpływ stałej dielektrycznej w obliczeniach PCM jest niewielki. Nie należy oczekiwać bardzo dobrej zgodności z eksperymentem ponieważ same dane doświadczalne pokazują duży rozrzut wyników, co potwierdza elastyczność strukturalną pozwalającą na dostosowanie klastrera do różnych konformacji otaczającego go białka. Modele: mały M0 i średni M1 są konformacyjnie giętkie. W wyniku obliczeń otrzymano dla nich dwie struktury charakteryzujące się odpowiednio małą i dużą odległością Ni_p -Fe1. Nie dzieje się tak w przypadku modeli dużych M2 i M3, dla których uwzględniono dalsze otoczenie białkowe, oraz struktur sprotonowanych i z ligandami. Zgodnie z przeprowadzonymi obliczeniami w przypadku model M2 i M3 otrzymano konformację zwartą o krótkiej odległości Ni_p -Fe1, dla form sprotonowanych pośrednią, co zaznacza się szczególnie dla modeli małych (M0 i M1), a dla klastrera A z ligandami uzyskano tylko konformację rozwartą.

- Rozkład gęstości spinowych pokazuje, że A_{ox} posiada konfigurację elektronową $[Fe_4S_4]^{+2}-Ni_p^{+2}Ni_d^{+2}$; A_{red1} $[Fe_4S_4]^{+2}-Ni_p^{+1}Ni_d^{+2}$, a niesparowany elektron jest zlokalizowany na Ni_p ; natomiast A_{red2} $[Fe_4S_4]^{+1}-Ni_p^{+1}Ni_d^{+2}$ i występuje tu sprzężenie antyferromagnetyczne między Ni_p i kubanem. Świadczą o tym przeciwne znaki gęstości spinowych na wymienionych fragmentach cząsteczki. Jest to zgodne z danymi doświadczalnymi i dostępnymi pracami obliczeniowymi. Rozkład elektronów w strukturach A_{red1} i A_{red2} sugeruje, że rolą kubanu oraz Ni_d jest stabilizacja różnych stopni utlenienia proksymalnego atomu niklu (Ni_p) przez przyjmowanie nadmiarowej gęstości elektronowej i tym samym zabezpieczanie go przed niepożądanymi reakcjami. Rozkład gęstości spinowych i ładunków NBO utrzymuje podobny charakter dla wszystkich modeli, za wyjątkiem modelu M0 oraz A_{red1} -CO. Ogólna tendencja do obniżania wartości gęstości spinowych i ładunków NBO dla modelu dużego (M3) może być spowodowana przesunięciem ładunku na skutek tworzenia się wiązań wodorowych pomiędzy resztami aminokwasowymi białka oraz atomami siarki i tlenu należącymi do klastrera A.
- Protonacja struktur zredukowanych A_{red1} i A_{red2} prowadzi do powstania wodorków, w których proton związany jest z proksymalnym atomem niklu (Ni_p). Jak wynika z obliczeń, struktura A_{red1} jest nietrwała i można ją łatwo zredukować, natomiast forma dwuelektronowo zredukowana jest trwała i może istnieć jako stabilna forma klastrera A. Ponadto wyznaczone na podstawie obliczeń dla wszystkich modeli wartości pK_a pokazują, że A_{red2} występuje w formie sprotonowanej w warunkach fizjologicznego, neutral-

nego pH. Wydaje się więc, że mechanizm dwuelektronowej redukcji połączonej z protonacją, jako sposób aktywacji formy utlenionej klastera A (A_{ox}) jest prawdopodobny. Niesprotonowane, zoptymalizowane struktury zredukowane A_{red1} i A_{red2} wykazują cechy strukturalne, które nie występują w danych krystalograficznych, co może być konsekwencją przyjętej trójkoordynacyjnej sfery wokół atomu Ni_p . Nie można jednak wykluczyć, że formy te istnieją jako stany pośrednie w reakcji katalitycznej. Realnym modelem wydają się być też ten z ligandem mrówczanowym, gdzie Ni_p wykazuje liczbę koordynacji cztery i dla którego otrzymano porównywalne z doświadczeniem wartości potencjałów redukcji.

- Zależność potencjałów redukcji od stałej dielektrycznej ϵ pokazuje, że na przebieg reakcji enzymatycznej silny wpływ ma środowisko reakcji. W mniej polarnych rozpuszczalnikach reakcja może mieć charakter rodnikowy, natomiast w rozpuszczalnikach polarnych przebiega prawdopodobnie według mechanizmu S_N2 . W świetle przeprowadzonych obliczeń stwierdzono, że potencjały redukcji dla modeli M0 i M1 są zbyt ujemne. Biorąc pod uwagę wartości potencjałów redukcji otrzymane dla modelu M1 można zaproponować mechanizm rodnikowy z redukcją metylokobalaminy przez A_{red2} w pierwszym kroku reakcji. Przebieg taki staje się jednak mniej prawdopodobny rozpatrując wyniki uzyskane dla modelu M3 i skłania do konkluzji, że reakcja może zachodzić według mechanizmu S_N2 . Ponieważ pierwszy potencjał redukcji obliczony dla modelu M3 jest wyższy niż -0.5 V, zaproponowano, że ligand elektrodonorowy, jakim jest anion mrówczanowy ($HCOO^-$), może wiązać się z proksymalnym atomem niklu (Ni_p) i dlatego nie dochodzi do redukcji formy utlenionej klastera (A_{ox}) w warunkach fizjologicznych. Jak wynika z przeprowadzonych obliczeń wartość pierwszego potencjału redukcji obniża się wtedy o około 0.7 V. Dla klastera A z ligandem mrówczanowym obliczone wartości potencjałów redukcji zależne od pH pozostają o około 0.4 V niższe od danych doświadczalnych. Aby otrzymać lepszą zgodność prawdopodobnie należałoby zwiększyć rozmiar układu czego w ramach niniejszej pracy nie próbowano.
- Żeby możliwa było metylacja klastera A, w pierwszym kroku reakcji konieczna jest jego deprotonacja. W trakcie metylacji metylokobalamina z CoFeSP zbliża się do proksymalnego atomu niklu Ni_p a oderwany proton jest przyjmowany przez zasadę. Obliczona wartość pK_a jest dość wysoka ($pK_a=15.6$ dla $\epsilon=20$), jednak pK_a zasady będącej akceptorem protonu nie musi być wyższe ze względu na zbliżenie się metylokobalaminy do klastera A, wtedy pK_a klastera A powinno się zmniejszać ze względu na tendencję do zastąpienia metylu przez proton. To według jakiego mechanizmu

przebiega reakcja metylacji, S_N2 czy mechanizmu rodnikowego, zależy od krótkotrwałe utworzonego sprotonowanego A_{red2} . Udział protonowanego klastra A potwierdza się na drodze rozważań nad energetyką reakcji. Sama metylacja jest silnie egzotermiczna, z kolei deprotonacja jest endotermiczna. W efekcie całkowita reakcja powinna być słabo endotermiczna. Tak też wynika z pomiarów kinetyki reakcji. Preferowany mechanizm, który wskazały obliczenia w niniejszej pracy to mechanizm S_N2 . Można dopuścić również częściowy udział mechanizmu rodnikowego w przypadku gdy steryczne oddziaływanie dwóch białek stanowi przeszkodę na drodze zbliżania się dwóch centrów metalicznych: Co i Ni_p . Koszt takiego częściowego mechanizmu rodnikowego może być niewielki, rzędu kilku kcal. Mechanizm rodnikowy wymaga przeniesienia elektronu na kobaltokorynę. Jednak w mechanizmie S_N2 to przeniesienie elektronu zasadniczo przy $\epsilon=80$ nie występuje.

Bibliografia

Literatura

- [1] J. C. Fontecilla-Camps, P. Amara, C. Cavazza, Y. Nicolet, A. Volbeda, *Nature* 460 (2009) 814.
- [2] S. W. Ragsdale, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 18571.
- [3] C. L. Drennan, J. W. Peters, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13 (2003) 220.
- [4] T. C. Harrop, P. K. Mascharak, *Coord. Chem. Rev.* 249 (2005) 3007.
- [5] C. Mehmet, A. A. Fraser, W. S. Ragsdale, *Chem. Rev.* 118 (2014) 4149.
- [6] E. L. Hegg, *Acc. Chem. Rev.* 37 (2004) 775.
- [7] P. A. Lindahl, *J. Biol. Inorg. Chem.* 9 (2004) 516.
- [8] X. Zhu, X. Tan, *Sci. China Ser. B-Chem.* 52 (2009) 2071.
- [9] M. R. Bramlett, A. Stubna, X. Tan, I. V. Surovtsev, E. Münck, P. A. Lindahl, *Biochemistry* 47 (2008) 5544.
- [10] G. Bender, T. A. Stich, L. Yan, S. P. Cramer, S. W. Ragsdale, *Biochemistry* 49 (2010) 7516.
- [11] T. C. Brunold, *J. Biol. Inorg. Chem.* 9 (2004) 533.
- [12] J. Q. Xia, Z. G. Hu, C.V. Popescu, P. A. Lindahl, E. Münck, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 8301.
- [13] P. Amara, A. Volbeda, J. C. Fontecilla-Camps, M. J. Field, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 2776.
- [14] R. P. Schenker, T. C. Brunold, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 13962.
- [15] C. E. Webster, M. Y. Darensbourg, P. A. Lindahl, M. B. Hall, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 3410.
- [16] C. Greco, A. Ciancetta, M. Bruschi, A. Kulesza, G. Moroc, U. Cosentino, *Chem. Commun.* 51 (2015) 8551.
- [17] M. Cossi, N. Rego, G. Scalmani, V. Barone, *J. Comp. Chem.* 24 (2003) 669.
- [18] J. Tomasi, B. Mennuci, R. Cammi, *Chem. Rev.* 105 (2005) 2999.

- [19] S. Gencic, D. A. Grahame, *Biochemistry* 47 (2008) 5544.
- [20] L. Piela, *Idee chemii kwantowej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
- [21] M. Jaworska, M. Musiał, T. Pluta, *Wybrane zagadnienia chemii kwantowej*, Uniwersytet Śląski, Katowice, 2009.
- [22] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev. B* 864 (1964) 139.
- [23] W. Koch, M. C. Holthausen, *A Chemist's Guide to Density Functional Theory-Second Edition*, Wiley-VCH, 2001.
- [24] F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry - Second Edition*, John Wiley and Sons, England, 2007.
- [25] W. Kohn, A. D. Becke, R. G. Parr, *J. Phys. Chem* 100 (1996) 12974.
- [26] R. G. Parr, Y. Weitao, *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, 1989.
- [27] A. D. Becke, *Phys. Rev. A* 38 (1988) 3098.
- [28] J. P. Perdew, *Phys. Rev. B* 33 (1986) 8822.
- [29] F. Himo, L. Noodleman, M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, *J. Phys. Chem. A* 106 (2002) 8757.
- [30] A. Kaczmarek-Kędziora, M. Ziegler-Borowska, D. Kędziora *Chemia obliczeniowa w laboratorium organicznym*, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, 2014.
- [31] C. Leger, F. Armstrong, *Chemistry of metals in biological systems*, Oxford, 2002.
- [32] E. I. Salomon, R. A. Scott, R. B. King *Computational Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, Wiley, 2009.
- [33] M. D. Tissandier, K. A. Cowen, W. Y. Feng, E. Gundiach, M. H. Cohen, A. D. Earhart, J. V. Coe, T. R. Tuttle, *J. Phys. Chem. A* 102 (1998) 7787.
- [34] J. Ho, M. L. Coote, *Theor. Chem. Acc.* 125 (2010) 3.
- [35] S. Trasatti, *Pure and Appl. Chem.* 58 (1986) 955.
- [36] M. D. Tissandier, K. A. Cowen, W. Y. Feng, E. Gundlach, M. H. Cohen, A. D. Earhart, J. V. Coe, T. R. Tuttle, *J. Phys. Chem. A* 102 (1998) 7787.

- [37] A. Lewis, J. A. Bumpus, D. G. Truhlar, C. J. Cramer, *J. Chem. Educ.* 81 (2004) 596.
- [38] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, *Podstawy biologii komórki, tom 1 i 2*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2005, s. 469–473.
- [39] L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymoczko, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2009.
- [40] R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1995.
- [41] A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel, *Metal Ions in Life Sciences* Wiley, 2008.
- [42] A. M. Sydor, D. B. Zamble *Metallomics and the Cell. Metal Ions in Life Sciences "Chapter 11: Nickel Metallomics: General Themes Guiding Nickel Homeostasis"* Springer, 2013.
- [43] C. Darnault, A. Volbeda, E. J. Kim, P. Legrand, X. Vernède, P. A. Lindahl, J. C. Fontecilla-Camps, *Nat. Struct. Biol.* 10 (2003) 271.
- [44] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry* 5th ed. New York: W. H. Freeman and Co. (2002) 697-733.
- [45] S. W. Ragsdale, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39 (2004) 165.
- [46] S. W. Ragsdale, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125 (2008) 129.
- [47] S. W. Ragsdale, E. Pierce, *Biochimica et Biophysica Acta* 1784 (2008) 1873.
- [48] D. J. Evans, *Coordination Chemistry Reviews* 249 (2005) 1582.
- [49] T. I. Doukov, L. C. Blasiak, J. Seravalli, S. W. Ragsdale, C. L. Drennan, *Biochemistry* 47 (2008) 3474.
- [50] T. Svetlitchnaia, V. Svetlitchnyi, O. Meyer, H. Dobbek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 14331.
- [51] V. Svetlitchnyi, H. Dobbek, W. Meyer-Klaucke, T. Meins, B. Thiele, P. Römer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 446.
- [52] S. Gencic, E. Duin, D. A. Grahame, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 15450.
- [53] C. L. Drennan, T. I. Doukov, S. W. Ragsdale, *J. Biol. Inorg. Chem.* 9 (2004) 511.

- [54] X. Tan, A. Volbeda, J. C. Fontecilla-Camps, P. A. Lindahl, *J. Biol. Inorg. Chem.* 11 (2006) 371.
- [55] W. Shin, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 9718.
- [56] W. Shin, P. A. Lindahl, *Biochemistry* 31 (1992) 12870.
- [57] X. Tan, M. Martinho, A. Stubna, P. A. Lindahl, E. Münck, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 6712.
- [58] X. Tan, M. R. Bramlett, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 5954.
- [59] J. Seravalli, S. W. Ragsdale, *Biochemistry* 47 (2008) 6770.
- [60] C. M. Gorst, S. W. Ragsdale, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 20687.
- [61] C. Fan, C. M. Gorst, W. Ragsdale, B. M. Hoffman, *Biochemistry* 30 (1991) 431.
- [62] S. J. George, J. Seravalli, S. W. Ragsdale, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 13500.
- [63] B. Bhaskar, E. DeMoll, D. A. Grahame, *Biochemistry* 37 (1988) 14491.
- [64] J. Seravalli, M. Kumar, S. W. Ragsdale, *Biochemistry* 41 (2002) 1807.
- [65] D. P. Barondeau, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 3959.
- [66] X. Tan, I. V. Surovtsev, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 12331.
- [67] *Gaussian 09, Revision B.01*, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Men-
nucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian,
A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara,
K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O.
Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro,
M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Ke-
ith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant,
S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E.
Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E.
Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski,
R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J.
J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V.
Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian Inc. Wallingford CT 2010.

- [68] A. Schaefer, C. Huber, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* 100 (1994) 5829.
- [69] L. Noodleman, J. G. Jr. Norman, *J. Chem. Phys.* 70 (1979) 4903.
- [70] L. Noodleman, *J. Phys. Chem.* 74 (1981) 5737.
- [71] W. -G. Han, L. Noodleman, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 2032.
- [72] D. P. Bhave, W. -G. Han, S. Pazicni, J. E. Penner-Hahn, K. S. Carroll, L. Noodleman, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 6610.
- [73] J. P. Foster, F. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7211.
- [74] A. E. Reed, R. B. Weinstock, F. Weinhold, *J. Chem. Phys.* 83 (1985) 735.
- [75] W. -G. Han, D. A. Giammona, D. Bashford, L. Noodleman, *Inorg. Chem.* 49 (2010) 7266.
- [76] W. -G. Han, T. Liu, T. Lovell, L. Noodleman, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 15778.
- [77] G. M. Ullman, L. Noodleman, D. A. Case, *J. Biol. Inorg. Chem.* 7 (2002) 632.
- [78] A. Lewis, J. A. Bumpus, D. G. Truhlar, C. J. Cramer, *J. Chem. Educ.* 84 (2007) 934.
- [79] G. J. Tawa, I. A. Topol, S. K. Burt, R. A. Caldwell, A. A. Rashin, *J. Chem. Phys.* 109 (1988) 4852.
- [80] A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski *J. Phys. Chem. A* 117 (2013) 12484.
- [81] W. Gu, S. Gencic, S. P. Cramer, D. A. Grahame, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 15343.
- [82] T. I. Doukov, T. M. Iverson, J. Seravalli, S. W. Ragsdale, C. L. Drennan, *Science* 298 (2002) 567.
- [83] J. Seravalli, W. Gu, A. Tam, E. Strauss, T. P. Begley, S. P. Cramer, S. P. Ragsdale, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 3689.
- [84] Y. Kung, T. I. Doukov, J. Seravalli, S. W. Ragsdale, C. L. Drennan, *Biochemistry* 48 (2009) 7432.
- [85] A. Volbeda, J. C. Fontecilla-Camps, *J. Biol. Inorg. Chem.* 9 (2004) 525.

- [86] J. Seravalli, S. W. Ragsdale, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 8384.
- [87] P. A. Lindahl, *J. Inorg. Biochem.* 106 (2012) 172.
- [88] A. Volbeda, C. Darnault, X. Tan, P. A. Lindahl, J. C. Fontecilla-Camps, *Biochemistry* 48 (2009) 7916.
- [89] C. A. Fitch, D. A. Karp, K. K. Lee, W. E. Stites, E. E. Lattman, B. Garcia-Moreno, *Biophys. J.* 82 (2002) 3289.
- [90] D. Bashford, M. Karplus, *Biochemistry* 29 (1990) 10219.
- [91] D. A. Karp, A. G. Gittis, M. R. Stahley, C. A. Fitch, W. E. Stites, B. Garcia-Moreno, *Biophys. J.* 92 (2007) 2041.
- [92] M. J. Harms, J. L. Schlessman, M. S. Chimenti, G. R. Sue, A. Damjanovic, B. Garcia-Moreno, *Protein Sci.* 17 (2008) 833.
- [93] W. -G. Han, L. Noodleman, *Theor. Chem. Acc.* 125 (2010) 305.
- [94] R. L. Birke, Q. Huang, T. Spataru, D. K. Gosser, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 1922.
- [95] D. Lexa, J. M. Saveant, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 2652.
- [96] D. Lexa, J. M. Saveant, *Acc. Chem. Res.* 16 (1983) 235.
- [97] M. Kumar, W. Galezowski, P. M. Kozlowski, *International Journal of Quantum Chemistry* 113 (2013) 479.
- [98] Y. Kung, N. Ando, T. I. Doukov, L. C. Blasiak, G. Bender, J. Seravalli, S. W. Ragsdale, C. L. Drennan, *Nature* 448 (2012) 265.
- [99] X. S. Tan, C. Sewell, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 6277.

Załączniki

A. Porównanie modelu M0 z cząsteczką wody i bez

Tablica A1. Energia struktur zoptymalizowanych, wybrane parametry geometryczne, gęstości spinowe i ładunki NBO dla zwartego modelu klastra A (M0) bez cząsteczki wody. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 20, 80$

Ładunek	$\epsilon=4$			$\epsilon=20$			$\epsilon=80$		
	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}
Spin	0	1/2	0	0	1/2	0	0	1/2	0
pK _a	22.5	37.9	55.7	10.1	17.6	30.3	7.5	13.6	24.5
E+12740[a.u.]	-8.97109	-9.05179	-9.09175	-9.01802	-9.14304	-9.25002	-9.02715	-9.16119	-9.28157
Ni _p -Ni _d	2.927	2.709	2.899	2.792	2.687	2.809	2.787	2.691	2.802
Ni _p -Fe1	2.721	2.609	2.486	2.658	2.584	2.474	2.655	2.584	2.471
Ni _p -S4	2.316	2.293	2.266	2.281	2.290	2.268	2.280	2.293	2.270
S6-Ni _p -S5	90.8	137.4	123.8	163.6	137.3	123.2	163.5	137.6	122.9
S6-Ni _p -S1	164.9	103.4	114.8	94.4	105.4	118.8	94.6	105.6	119.0
S1-Ni _p -S5	79.8	81.1	83.5	80.1	81.7	83.1	80.2	81.9	83.2
Fe1-S6-Ni _p	74.1	70.3	66.5	71.3	69.4	66.1	71.2	69.4	66.0
Ni _p -S2-Ni _d	120.4	106.3	121.8	112.0	105.6	113.6	112.4	107.8	113.9
Gęstości spinowe									
Ni _p	0.047	-0.421	0.371	0.218	-0.422	0.335	0.211	-0.421	0.335
Ni _d	0.004	-0.080	0.009	0.037	-0.096	0.011	0.037	-0.099	0.015
Fe ₄ S ₄	0.087	-0.242	-0.426	-0.277	-0.218	-0.381	-0.284	-0.213	-0.408
Ładunki NBO									
Ni _p	0.004	0.018	-0.106	-0.001	0.002	-0.128	0.000	0.001	-0.134
Ni _d	0.082	0.072	0.072	0.076	0.072	0.044	0.075	0.071	0.040
Fe ₄ S ₄	-0.592	-0.841	-1.088	-0.576	-0.893	-1.173	-0.575	-0.906	-1.202

Tablica A2. Energia struktur zoptymalizowanych, wybrane parametry geometryczne, gęstości spinowe i ładunki NBO dla zwartego modelu klastra A (M0) z cząsteczką wody. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 20, 80$

	$\epsilon=4$			$\epsilon=20$			$\epsilon=80$		
	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}
Ładunek	-2	-3	-4	-2	-3	-4	-2	-3	-4
Spin	0	1/2	0	0	1/2	0	0	1/2	0
pK _a	8.5	25.3	52.1	-0.9	3.7	21.3	-4.1	-0.4	15.3
E+128220[a.u.]	-5.44285	-5.52400	-5.56281	-5.48702	-5.61444	-5.71726	-5.49618	-5.63225	-5.74750
Ni _p -Ni _d	2.864	2.699	2.698	2.841	2.688	2.655	2.844	2.683	2.652
Ni _p -FeI	3.747	2.572	2.507	3.786	2.569	2.467	3.745	2.563	2.464
Ni _p -O(H ₂ O)	1.984	-	-	1.982	-	-	1.981	-	-
S6-Ni _p -S5	95.3	166.9	160.6	95.1	168.2	163.0	95.8	168.7	163.2
S6-Ni _p -S1	170.0	105.1	106.3	168.9	104.9	107.1	168.3	104.6	107.5
S1-Ni _p -S5	81.4	83.1	82.2	81.5	83.0	82.0	81.5	82.9	82.2
FeI-S6-Ni _p	109.3	70.8	66.8	111.0	70.8	65.3	109.1	70.6	65.3
Ni _p -S2-Ni _d	119.0	109.0	107.9	117.1	109.3	104.5	119.1	108.0	105.5
Gęstości spinowe									
Ni _p	0.023	-0.185	0.548	0.027	-0.166	0.477	0.028	-0.176	0.483
Ni _d	0.011	0.001	0.030	0.009	0.001	0.034	0.009	0.001	0.036
Fe ₄ S ₄	0.179	-0.542	-0.624	0.169	-0.569	-0.529	0.173	-0.558	-0.534
H ₂ O	0.000	-	-	0.000	-	-	0.000	-	-
Ładunki NBO									
Ni _p	0.134	0.050	0.060	0.136	0.042	0.001	0.134	0.045	-0.012
Ni _d	0.072	0.069	0.057	0.063	0.060	0.039	0.061	0.057	0.034
Fe ₄ S ₄	-0.728	-0.949	-1.199	-0.736	-1.000	-1.283	-0.735	-1.013	-1.311
H ₂ O	0.129	-	-	0.133	-	-	0.129	-	-

Tablica A3. Energia struktur zoptymalizowanych, wybrane parametry geometryczne, gęstości spinowe i ładunki NBO dla rozwartego modelu klastra A (M0a) bez cząsteczki wody. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 20, 80$

	$\epsilon=4$			$\epsilon=20$			$\epsilon=80$		
	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}
Ładunek	-2	-3	-4	-2	-3	-4	-2	-3	-4
Spin	0	1/2	0	0	1/2	0	0	1/2	0
pK_a	10.2	31.0	51.4	-2.8	9.8	20.5	-5.2	5.6	14.3
E+12740[a.u.]	-8.94443	-9.03673	-9.07526	-8.98993	-9.12593	-9.22871	-8.99952	-9.14372	-9.25946
Ni_p-Ni_d	2.662	2.681	2.698	2.697	2.647	2.636	2.699	2.639	2.636
Ni_p-Fe1	4.009	4.073	4.149	4.019	4.004	3.879	4.021	3.980	3.879
Ni_p-S4	4.498	4.779	4.859	4.507	4.547	4.651	4.506	4.509	4.651
S6- Ni_p-S5	120.5	127.2	129.6	116.1	125.7	124.2	115.5	124.8	124.2
S6- Ni_p-S1	154.0	146.4	144.6	159.2	148.0	149.1	159.9	148.9	149.1
S1- Ni_p-S5	85.2	86.0	85.6	84.6	86.0	86.7	84.6	86.1	86.7
Fe1-S6- Ni_p	129.2	133.5	133.7	128.7	129.5	119.5	128.6	128.1	119.5
$Ni_p-S2-Ni_d$	111.1	112.0	112.7	112.5	108.2	110.2	112.6	108.2	109.1
Gęstości spinowe									
Ni_p	-0.079	-0.583	-0.639	0.015	-0.588	-0.634	0.020	-0.589	-0.639
Ni_d	0.141	-0.046	-0.031	-0.020	-0.050	-0.039	-0.021	-0.052	-0.051
Fe_4S_4	0.099	-0.074	0.902	0.108	-0.061	0.911	0.104	-0.057	0.926
Ładunki NBO									
Ni_p	0.170	0.076	0.075	0.218	0.066	0.043	0.233	0.061	0.036
Ni_d	0.109	0.057	0.041	0.096	0.044	0.029	0.096	0.042	0.034
Fe_4S_4	-0.645	-0.796	-1.217	-0.684	-0.847	-1.342	-0.692	-0.860	-1.381

Tablica A4. Energia struktur zoptymalizowanych, wybrane parametry geometryczne, gęstości spinowe i ładunki NBO dla rozwartego modelu klastra A (M0a) z cząsteczką wody. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 20, 80$

Ładunek	$\epsilon=4$			$\epsilon=20$			$\epsilon=80$		
	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}
Spin	0	1/2	0	0	1/2	0	0	1/2	0
pK _a	16.0	27.2	55.3	5.4	7.0	25.9	2.6	3.0	19.0
E+ 28220[a.u.]	-5.42663	-5.51997	-5.55638	-5.47334	-5.60745	-5.70736	-5.48171	-5.62479	-5.73961
Ni _p -Ni _d	2.542	2.637	2.666	2.531	2.623	2.625	2.540	2.619	2.607
Ni _p -FeI	4.039	4.002	4.065	4.030	3.925	3.987	4.028	3.921	3.882
Ni _p -O(H ₂ O)	2.100	-	-	2.094	-	-	2.115	-	-
S6-Ni _p -S5	120.3	122.4	125.	117.6	122.0	124.5	120.0	122.1	126.8
S6-Ni _p -S1	143.3	150.9	148.5	144.9	151.3	149.3	143.2	151.2	146.4
S1-Ni _p -S5	84.5	86.4	86.8	83.6	86.6	86.0	83.5	86.6	86.4
FeI-S6-Ni _p	126.8	128.2	128.8	125.8	123.9	125.8	125.6	123.7	120.6
Ni _p -S2-Ni _d	100.6	108.2	112.1	98.7	108.8	107.1	100.4	107.7	107.6
Gęstości spinowe									
Ni _p	0.037	-0.581	-0.531	0.032	-0.582	-0.598	-0.003	-0.581	-0.581
Ni _d	0.239	-0.063	-0.029	0.221	-0.064	-0.045	0.146	-0.063	-0.052
Fe ₄ S ₄	0.013	-0.048	0.730	0.028	-0.040	0.858	0.028	-0.036	0.719
H ₂ O	0.043	-	-	0.044	-	-	-0.006	-	-
Ładunki NBO									
Ni _p	0.241	0.021	-0.021	0.235	0.028	-0.015	0.257	0.026	-0.052
Ni _d	0.136	0.068	0.049	0.130	0.060	0.042	0.126	0.057	0.038
Fe ₄ S ₄	-0.786	-0.839	-1.178	-0.807	-0.884	-1.321	-0.815	-0.892	-1.279
H ₂ O	0.123	-	-	0.127	-	-	0.120	-	-

Tablica A5. Energia struktur zoptymalizowanych, wybrane parametry geometryczne, gęstości spinowe i ładunki NBO dla protonowanego modelu klastra A (M0-H) bez cząsteczki wody. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 20, 80$

Ładunek	$\epsilon=4$			$\epsilon=20$			$\epsilon=80$		
	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}
Spin	0	1/2	0	0	1/2	0	0	1/2	0
E+12740[a.u.]	-9.43109	-9.55692	-9.64131	-9.44972	-9.60202	-9.73231	-9.45369	-9.61116	-9.75047
Ni _p -Ni _d	2.724	2.792	2.797	2.721	2.766	2.760	2.693	2.759	2.758
Ni _p -FeI	2.580	2.572	2.613	2.584	2.574	2.605	2.603	2.574	2.607
Ni _p -H	1.572	1.559	1.517	1.570	1.557	1.516	1.571	1.557	1.517
S6-Ni _p -S5	102.1	103.8	105.5	102.1	103.8	105.8	102.6	103.6	105.7
S6-Ni _p -S1	173.4	173.6	166.5	173.6	173.9	166.1	174.2	173.7	166.2
S1-Ni _p -S5	83.1	82.6	82.4	83.1	82.3	82.2	83.2	82.3	82.2
FeI-S6-Ni _p	71.6	70.9	69.6	71.7	71.1	69.3	72.3	71.1	69.4
Ni _p -S2-Ni _d	111.9	116.2	114.0	112.3	112.3	112.0	109.7	113.0	111.8
Gęstości spinowe									
Ni _p	-0.120	-0.048	0.229	-0.126	-0.045	0.238	-0.139	-0.043	0.239
Ni _d	-0.220	0.002	0.030	-0.210	0.000	0.036	-0.230	0.000	0.036
Fe ₄ S ₄	0.226	-1.089	-0.257	0.205	-1.086	-0.274	0.274	-1.085	-0.277
H	0.018	0.018	-0.022	0.018	0.018	-0.022	0.018	0.018	-0.022
Ładunki NBO									
Ni _p	-0.098	-0.121	-0.168	-0.079	-1.121	-0.180	-0.061	-0.121	-0.183
Ni _d	0.153	0.081	0.068	0.150	0.070	0.051	0.157	0.066	0.047
Fe ₄ S ₄	-0.610	-0.883	-0.870	-0.577	-0.894	-0.932	-0.549	-0.895	-0.946
H	0.105	0.106	0.061	0.104	0.103	0.059	0.105	0.103	0.057

Tablica A6. Energia struktur zoptymalizowanych, wybrane parametry geometryczne, gęstości spinowe i ładunki NBO dla protonowanego modelu klastra A (M0-H) z cząsteczką wody. Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=4, 20, 80$

	$\epsilon=4$			$\epsilon=20$			$\epsilon=80$		
	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}	A_{ox}	A_{red1}	A_{red2}
Ładunek	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
Spin	0	1/2	0	0	1/2	0	0	1/2	0
E+I2820[a.u.]	-5.89909	-6.01680	-6.11394	-5.92284	-6.06034	-6.20144	-5.92509	-6.06909	-6.21860
Ni _p -Ni _d	2.820	2.704	2.848	2.848	2.701	2.832	2.831	2.696	2.831
Ni _p -Fe1	3.792	3.817	3.856	3.857	3.824	3.688	3.820	3.836	3.770
Ni _p (S)-H	1.364	1.477	1.480	1.363	1.478	1.481	1.363	1.478	1.482
S6-Ni _p -S5	95.2	109.5	108.9	95.3	109.0	108.5	94.8	109.0	108.4
S6-Ni _p -S1	171.9	165.9	168.9	170.8	165.9	168.1	170.8	165.8	168.8
S1-Ni _p -S5	81.7	83.2	81.8	81.6	83.3	81.9	81.3	83.3	82.0
Fe1-S6-Ni _p	113.1	115.6	116.7	115.9	115.9	109.2	114.9	116.4	113.0
Ni _p -S2-Ni _d	116.4	109.4	118.0	117.2	109.5	118.1	117.5	110.4	117.5
Gęstości spinowe									
Ni _p	0.026	-0.193	0.039	0.029	-0.190	0.039	-0.035	-0.224	0.036
Ni _d	0.038	-0.221	0.007	0.015	-0.217	0.006	-0.026	-0.248	0.007
Fe ₄ S ₄	0.269	-0.345	0.035	0.288	-0.351	0.058	0.115	-0.251	0.056
H ₂ O	-0.004	-	-	-0.002	-	-	0.002	-	-
H	0.003	0.014	0.005	0.003	0.015	0.005	0.004	0.015	0.005
Ładunki NBO									
Ni _p	0.016	-0.175	-0.220	0.131	-0.189	-0.235	0.142	-0.172	-0.243
Ni _d	0.084	0.141	0.053	0.072	0.133	0.039	0.070	0.149	0.037
Fe ₄ S ₄	-0.699	-0.612	-0.783	-0.601	-0.591	-0.813	-0.541	-0.639	-0.835
H ₂ O	0.170	-	-	0.174	-	-	0.174	-	-
H	0.177	-0.035	-0.069	0.184	-0.029	-0.079	0.190	-0.026	-0.076

B. Miejsca protonacji klastera A rozważane w obliczeniach

Tablica B1. Energia struktur zoptymalizowanych, wybrane parametry geometryczne, gęstości spinowe i ładunki NBO dla modelu M1-H (A_{red2}). Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=20$. Uwzględnione są różne miejsca protonacji, a wartość najmniejszej energii została podana pogrubioną czcionką

	$A_{red2-S7}$	$A_{red2-S2}$	$A_{red2-S1}$	$A_{red2-S6}$	$A_{red2-NiH}$
Ładunek	-3	-3	-3	-3	-3
Spin	0	0	0	0	0
pK _a	12.7	6.3	20.8	15.9	27.6
E+13399[a.u.]	-0.66839	-0.65448	-0.68588	-0.67524	-0.70051
Ni _p -Ni _d	3.068	3.105	3.808	3.080	2.945
Ni _p -Fe1	2.504	2.528	2.435	2.530	2.737
S-H	1.369	1.373	1.371	1.391	1.471
S6-Ni _p -S5	121.5	125.3	127.4	119.6	110.7
S6-Ni _p -S1	135.4	133.3	111.6	136.6	167.2
S1-Ni _p -S5	82.0	82.5	64.1	82.9	81.9
Fe1-S6-Ni _p	66.8	68.3	64.8	68.5	73.4
Ni _p -S2-Ni _d	132.6	135.9	149.4	134.9	124.5
Gęstości spinowe					
Ni _p	0.321	0.289	0.165	0.380	-0.147
Ni _d	0.017	0.005	0.005	0.007	-0.011
Fe ₄ S ₄	-0.272	-0.171	-0.129	-0.315	0.033
H	-0.004	0.017	0.000	-0.010	0.004
Ładunki NBO					
Ni _p	-0.064	-0.120	0.030	-0.132	-0.237
Ni _d	0.058	0.050	0.087	0.049	0.043
Fe ₄ S ₄	-0.705	-1.105	-1.057	-1.005	-0.802
H	0.175	0.178	0.167	0.197	0.017

Tablica B2. Energia struktur zoptymalizowanych, wybrane parametry geometryczne, gęstości spinowe i ładunki NBO dla modelu M3-H (A_{red}). Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=20$. Uwzględnione są różne miejsca protonacji, a wartość najniższej energii została podana pogrubioną czcionką

	$A_{red1-S7}$	$A_{red1-S2}$	$A_{red1-S1}$	$A_{red1-S6}$	$A_{red1-NiH}$
Ładunek	-1	-1	-1	-1	-1
Spin	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
pK _a	-14.3	-7.4	-5.8	-6.3	-1.2
E+16030[a.u.]	-0.76248	-0.77745	-0.78094	-0.77987	-0.79151
Ni _p -Ni _d	3.085	3.099	3.771	3.115	2.968
Ni _p -FeI	2.621	2.593	2.482	2.565	2.687
S-H	1.370	1.361	1.369	1.478	1.470
S6-Ni _p -S5	115.1	114.9	121.5	116.4	111.7
S6-Ni _p -S1	151.8	148.3	107.5	142.8	162.4
S1-Ni _p -S5	81.1	80.8	64.3	81.1	82.0
FeI-S6-Ni _p	70.2	69.3	67.8	69.4	72.1
Ni _p -S2-Ni _d	134.1	134.7	147.6	134.5	123.4
Gęstości spinowe					
Ni _p	0.685	-0.634	0.377	-0.642	-0.067
Ni _d	0.106	0.829	0.045	-0.039	0.027
Fe ₄ S ₄	-0.111	0.044	0.297	1.759	-0.035
H	-0.005	0.005	0.000	-0.002	-0.027
Ładunki NBO					
Ni _p	0.148	0.120	0.101	0.042	-0.264
Ni _d	-0.103	0.092	0.107	0.082	0.108
Fe ₄ S ₄	-0.265	-0.546	-0.570	-0.552	-0.318
H	0.185	0.209	0.172	0.264	0.089

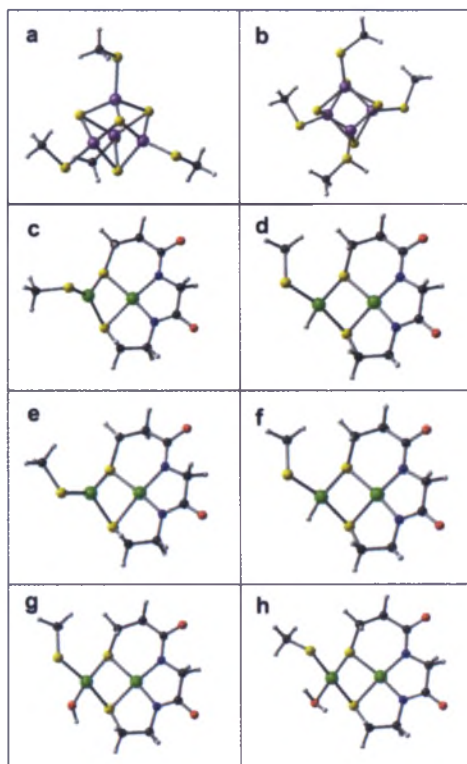
Tablica B3. Energia struktur zoptymalizowanych, wybrane parametry geometryczne, gęstości spinowe i ładunki NBO dla modelu M3-H (A_{red2}). Wyniki obliczeń metodą DFT/BP86 w bazie funkcyjnej TZVP z zastosowaniem modelu PCM/ $\epsilon=20$. Uwzględnione są różne miejsca protonacji, a wartość najniższej energii została podana pogrubioną czcionką

	A_{red2} -S7	A_{red2} -S2	A_{red2} -S1	A_{red2} -S6	A_{red2} -NiH
Total Charge	-2	-2	-2	-2	-2
Spin	0	0	0	0	0
pK _a	-6.5	-1.9	3.9	3.4	15.6
E+16030[a.u.]	-0.90613	-0.90857	-0.92116	-0.92024	-0.94657
Ni _p -Ni _d	3.125	3.086	3.654	3.087	2.917
Ni _p -FeI	2.548	2.579	2.464	2.549	2.696
S-H	1.369	1.362	1.369	1.415	1.469
S6-Ni _p -S5	120.4	115.7	111.2	116.9	111.2
S6-Ni _p -S1	141.8	145.4	127.4	140.4	167.0
S1-Ni _p -S5	81.1	82.0	68.2	82.1	81.8
FeI-S6-Ni _p	67.9	68.4	66.1	69.2	72.7
Ni _p -S2-Ni _d	135.2	133.5	146.7	133.3	122.3
Gęstości spinowe					
Ni _p	0.768	-0.541	0.117	0.467	-0.074
Ni _d	0.062	-0.053	-0.009	0.010	0.000
Fe ₄ S ₄	-0.928	0.743	-0.157	-0.465	-0.373
H	-0.031	-0.005	0.000	-0.007	-0.065
Ładunki NBO					
Ni _p	0.117	0.074	0.006	-0.079	-0.228
Ni _d	0.088	0.081	0.083	0.063	0.060
Fe ₄ S ₄	-0.675	-1.028	-0.813	-0.820	-0.676
H	0.188	0.195	0.168	0.220	0.035

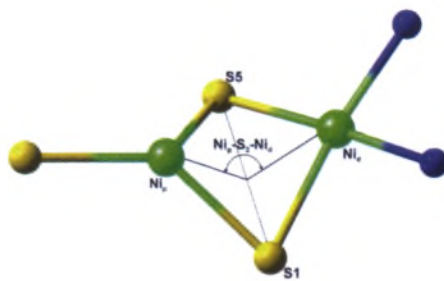
C. ΔZPE i kąt dwuścienny

Tablica C1. Wartości ΔZPE dla małych modeli

MODEL	STRUKTURA	ΔZPE (kcal/mol)
A_{ox} -S2H	a,b	6.1
A_{red1} -NiH	c,d	4.9
A_{red2} -NiH	e,f	5.7
A_{ox} -H ₂ O	g,h	7.2



Rysunek C1. Struktury małych modeli do obliczenia wartości ΔZPE



Rysunek C2. Kąt dwuścienny

Dorobek naukowy

Publikacje

1. A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski, „Catalytic mechanism of Acetyl CoA synthase. The insight from DFT calculations” praca w przygotowaniu
2. A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski, „Redox potentials and protonation of the A-cluster from acetyl-CoA synthase. A density functional theory study” *J. Phys. Chem. A* **117** (2013) 12484-12496
3. P. Sitek, M. Jaworska, P. Lodowski, A. Chmielowska, „Methyl transfer reaction between MeI and Ni(PPh₂CH₂CH₂SEt)₂ complex. A DFT study” *Inorganic Chemistry Communications* **29** (2013) 65-69
4. A. Chmielowska, P. Zerzucha, T. Pluta, „Dipole moment and polarizability of furan and chlorofuran” *Annals of the Polish Chemical Society* **2** (2003) 904

Prezentacje ustne

1. A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski
Geometria i struktura elektronowa klastera A w syntazie acetylo-CoA,
53 ZJAZD PTCH I SITPCHEM, Gliwice 2010
2. A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski
Geometria i struktura elektronowa klastera A syntazy acetylo-CoA
52 ZJAZD PTCH I SITPCHEM, Łódź 2009

Postery

1. A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski
Wpływ modelu strukturalnego i otoczenia białkowego na wartość potencjałów redoks klastera A w syntazie acetylokoenzymu A
57 ZJAZD PTCHEM I SITPCHEM, Częstochowa 2014
2. A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski
Wpływ otoczenia białkowego na wartość potencjałów redoks klastera A w syntazie acetylo-CoA
56 ZJAZD PTCHEM I SITPCHEM, Siedlce 2013
3. A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski
Alkylacja kobynamidu z udziałem halogenków alkilowych: Mechanizm rodnikowy czy S_N2?
55 ZJAZD PTCHEM I SITPCHEM, Białystok 2012

4. P. Sitek, A. Chmielowska, M. Jaworska
DFT calculations of geometries and redox potentials for cobalt and nickel complexes
11-TH CENTRAL EUROPEAN SYMPOSIUM ON THEORETICAL CHEMISTRY, Mariapfarr, Austria, 2012
5. A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski
Cobinamide alkylation by alkyl halides: radical or S_N2 mechanism? A DFT study
11-TH CENTRAL EUROPEAN SYMPOSIUM ON THEORETICAL CHEMISTRY, Mariapfarr, Austria 2012
6. A. Chmielowska, M. Jaworska
DFT study of MFe_4S_4 clusters ($M=Ni, Co$)
10-TH CENTRAL EUROPEAN SYMPOSIUM ON THEORETICAL CHEMISTRY, Toruń 2011
7. A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski
Mechanism of methyl transfer reaction between methylcobalamin and A-cluster in acetyl-CoA synthase (ACS). DFT calculations
3-RD QUANTUM BIOINORGANIC CHEMISTRY, Český Krumlov, Czechy 2011
8. A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski
Mechanizm reakcji przeniesienia metylu pomiędzy metylokobaltokoryną i klasterem A w syntezie acetylo-koenzymu A (ACS). Obliczenia DFT
HITY 2011 - ZASTOSOWANIE TEORII W BADANIACH MOLEKULARNYCH, Kraków 2010
9. A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski
Geometria i struktura elektronowa klastera A w syntezie acetylo-CoA
53 ZJAZD PTCHEM I SITPCHEM, Gliwice, 2010
10. A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski
Structure and electronic properties of A-cluster in Acetyl-CoA synthase: insight from DFT
9-TH CENTRAL EUROPEAN SYMPOSIUM ON THEORETICAL CHEMISTRY, Nový Smokovec, Słowacja 2010
11. A. Chmielowska, M. Jaworska, P. Lodowski
Geometry and electronic structure of A-cluster in Acetyl-CoA synthase
MODELING & DESIGN OF MOLECULAR MATERIALS, Wrocław 2010
12. A. Chmielowska, P. Zerzucha, T. Pluta
Teoretyczne wyznaczenie molekularnych własności elektrycznych i energii przejść elektronowych cząsteczki pirydyny
XLIX ZJAZD PTCHEM I SITPCHEM, Gdańsk 2006

13. A. Chmielowska, P. Zerzucha, T. Pluta
Teoretyczne wyznaczanie molekularnych własności elektrycznych dwuazotowych pochodnych furanu i tiofenu
XLVII ZJAZD PTCHEM I SITPCHEM, Wrocław 2004
14. A. Chmielowska, P. Zerzucha, T. Pluta
Teoretyczne wyznaczanie molekularnych własności elektrycznych furanu i jego chloro pochodnych
XLVI ZJAZD PTCHEM I SITPCHEM, Lublin 2003