

© Коллектив авторов

## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ХРОМОГЕННОГО СУБСТРАТА ПАРА-НИТРОФЕНИЛАЦЕТАТА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗЫ-1 ЧЕЛОВЕКА

А.М. Кулакова<sup>1\*</sup>, М.Г. Хренова<sup>1,2</sup>, А.В. Немухин<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3; \*эл. почта: kulakova@lcc.chem.msu.ru

<sup>2</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2

<sup>3</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

Карбоксилэстеразы человека участвуют в защитных процессах детоксикации организма при гидролитическом метаболизме ксенобиотиков, и знание молекулярных механизмов гидролиза субстратов в активных центрах этих ферментов необходимо для рационального дизайна лекарственных препаратов. В работе определён молекулярный механизм реакции гидролиза пара-нитрофенилацетата в активном центре карбоксилэстеразы человека с использованием современных методов атомарного моделирования. По данным расчётов комбинированным методом квантовой механики / молекулярной механики реакция проходит через четыре элементарные стадии — две относятся к стадии ацилирования, две — к стадии деацилирования. Все элементарные стадии химической реакции проходят с низкими энергетическими барьерами, и каждый последующий реакционный интермедиат расположен по энергии ниже предыдущего, что ускоряет прохождение реакции в прямом направлении. Методом молекулярного докинга проведена оценка констант связывания фермента с субстратом и диссоциации продуктов. С использованием найденных констант численным решением дифференциальных кинетических уравнений определены кинетические параметры ферментативного гидролиза в активном центре карбоксилэстеразы.

**Ключевые слова:** молекулярное моделирование; квантовая механика/молекулярная механика; докинг; карбоксилэстераза; гидролиз

**DOI:** 10.18097/PBMC20216703300

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших механизмов защитного процесса детоксикации организма является метаболизм ксенобиотиков, включающих лекарственные вещества, пищевые добавки и др. В организме человека данный процесс протекает в основном в тканях почек и печени и включает в себя разнообразные ферментативные реакции. На первой стадии гидролитического метаболизма одну из ключевых ролей играют карбоксилэстеразы [1]. В организме человека наиболее важными являются карбоксилэстераза-1 (КЭ1) и карбоксилэстераза-2 (КЭ2).

В настоящей работе в качестве объекта исследования выбрана реакция гидролиза в активном центре карбоксилэстеразы-1 человека (КЭ1). Данный фермент класса сериновых гидролаз, находящийся в эндоплазматическом ретикулуме и цитозоле клеток печени человека, обладает широкой субстратной специфичностью. [2] Способность гидролизовать субстраты, содержащие сложноэфирную, карбаматную или амидную группировки, позволяет КЭ1, как и другим карбоксилэстеразам, принимать участие в активации многих этерифицированных пролекарств различных классов (противовирусные средства, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, иммунодепрессанты) и инактивации различных препаратов, действующих на центральную нервную систему (метилфенидат, кокаин, героин и др.) [3]. Повышенный интерес вызывает процесс

ингибирования данного фермента, который позволит регулировать метаболизм пролекарств, что обеспечит их биодоступность и уменьшит токсичность.

С точки зрения изучения кинетики гидролиза сложных эфиров удобным является хромогенный субстрат пара-нитрофенилацетат (*n*-НФА), поскольку в ходе реакции образуется пара-нитрофенол, который в щелочной среде переходит в анионную форму, имеющую жёлтую окраску, и может быть легко определен спектрофотометрическими методами. В литературе имеется множество данных по кинетике гидролиза *n*-НФА КЭ1 [4-6], в которых значения кинетических параметров отличаются в пределах порядка в зависимости от образцов ткани, из которых получали клетки, содержащие КЭ1. Экспериментальное значение константы Михаэлиса находится в микромолярном диапазоне и составляет  $106,6 \pm 10,1$  мкМ, а значение максимальной скорости ферментативной реакции  $V_{\max} = 493,9 \pm 14,3$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> белка [4].

Нами изучен механизм гидролиза пара-нитрофенилацетата в активном центре карбоксилэстеразы-1 человека с использованием методов молекулярного моделирования. Предложена кинетическая схема, с помощью которой построены зависимости концентраций продуктов от времени. Это позволило перейти от кинетических параметров элементарных стадий, получаемых в расчётах, к эффективным величинам, наблюдаемым в эксперименте.



## МЕТОДИКА

В качестве исходной структуры для расчётов использовался кристалл комплекса КЭ1 человека с коэнзимом А (PDB ID 2H7C) [7], из которого был взят мономер С с наиболее полно определённой структурой. Данный мономер был достроен до полноатомной модели путём добавления плохо разрешённых в ходе рентгеноструктурного анализа остатков, согласно аминокислотной последовательности изоформы 1 (UniProt P23141). Недостающие атомы водорода добавлялись с помощью программы Reduce [8].

*Пара*-нитрофенилацетат помещали в активный центр фермента методом молекулярного докинга, который проводился в приближении “жёсткий белок – гибкий лиганд” с использованием генетического алгоритма Ламарка, реализованного в программном пакете Autodock [9]. Предварительная оптимизация геометрии лиганда проводилась методом теории функционала электронной плотности в варианте Кона-Шэма B3LYP/6-31G\*\* в программном пакете ORCA [10]. Оценочная функция программы Autodock основана на силовом поле AMBER и позволяет давать хорошую оценку как энергетических параметров, так и геометрических характеристик белковых систем.

Полученную в результате молекулярного докинга полноатомную модель комплекса КЭ1 с *n*-НФА сольватировали молекулами воды до образования прямоугольной ячейки таким образом, чтобы расстояние от атомов белка до границы ячейки было больше 10 Å. Общий заряд в системе нейтрализовывали путём добавления пяти ионов натрия. Для релаксации полученной модели использовали классическую молекулярную динамику в программном пакете NAMD с использованием силового поля CHARMM [11] для белка, CGenFF [12] для лиганда и TIP3P [13] для воды. На последних стадиях молекулярной динамики (общей длительностью 15 нс) была выбрана структура с наименьшим расстоянием между атомом углерода сложноэфирной группы *n*-НФА и атомом кислорода Ser221. Характеристики данной модельной структуры: RMSD белка — 1,2 Å, RMSD активного центра — 0,5 Å.

При подготовке модельной системы для расчётов комбинированным методом квантовой механики / молекулярной механики (КМ/ММ) размер водной оболочки уменьшался до 4 Å от поверхности белка. При расчёте методом КМ/ММ в программном пакете NWChem [14] квантовую подсистему описывали методом теории функционала электронной плотности с функционалом PBE0 [15] и базисом 6-31G\*\*, ММ-подсистему описывали в рамках силового поля AMBER [16]. В квантовую подсистему были включены остатки каталитической триады (Ser221, His468, Glu354), оксианионного центра (Gly142, Gly143, Ala222), *n*-НФА, молекула воды.

В работе проводили частичный колебательный анализ, то есть рассчитывали гессиан только для КМ подсистемы в рамках КМ/ММ расчёта (вклады от зарядов атомов ММ части учитывали

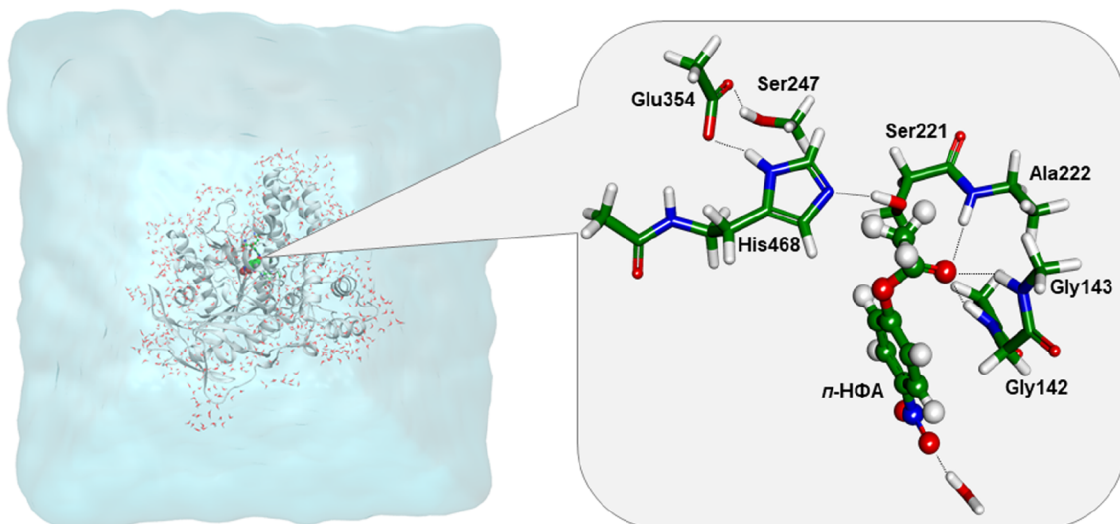
в одноэлектронной части Гамильтониана КМ подсистемы). Все найденные минимумы характеризуются действительным набором частот, в переходных состояниях одна частота мнимая и отвечает координате реакции, что было видно из визуализации. Для поиска переходных состояний проводили последовательное моделирование структур с постепенным изменением координаты реакции и оптимизацией всех остальных геометрических параметров системы. Для структуры с наибольшей энергией вдоль этого пути рассчитывали гессиан и проводили поиск переходного состояния, соответствующего выбранной мнимой частоте. Из найденного переходного состояния проводился спуск в обе стороны для подтверждения структур предшествующего и последующего интермедиатов. Для перехода от потенциальной энергии к энергии Гиббса при 298 К рассчитывали статистические суммы в стационарных точках в приближении гармонического осциллятора и жёсткого ротатора. Структуры всех стационарных точек депонированы в ZENODO и доступны по ссылке <https://doi.org/10.5281/zenodo.4730235>. Подготовку и визуализацию структур проводили с помощью программы VMD [17].

Численное решение системы дифференциальных кинетических уравнений проводили в программном пакете KINET [18]. В серии численных экспериментов с начальной концентрацией фермента 10 мкМ и варьируемой начальной концентрацией субстрата 10-1000 мкМ были оценены скорости реакций в начальный момент времени. Используя уравнение Михаэлиса-Ментен в двойных обратных координатах, были оценены значения константы Михаэлиса ( $K_M$ ) и максимальная скорость ( $V_{max}$ ), из которой определена каталитическая константа ( $k_{cat}$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активный центр карбоксилэстеразы располагается на дне узкого канала и включает в себя аминокислотные остатки Ser221, His468, Glu354, образующие каталитическую триаду, и остатки оксианионного центра Gly142, Gly143, Ala222, способствующие стабилизации тетраэдрического интермедиата в ходе реакции (рис. 1).

Конформационный поиск положения лиганда проводили в области активного центра карбоксилэстеразы, а также на всей поверхности фермента методом молекулярного докинга. Наилучшее значение оценочной функции соответствует положению лиганда в активном центре, при котором атом кислорода сложноэфирной группы *n*-НФА стабилизирован водородными связями с NH-группами основных цепей аминокислотных остатков Gly142, Gly143, Ala222 оксианионного центра, *пара*-нитрофенильная группа расположена вдоль канала и стабилизирована водородной связью между кислородом нитрогруппы и гидроксильной группой Thr151, а метильный фрагмент располагается в небольшом гидрофобном кармане.



**Рисунок 1.** Полноатомная модель (слева) комплекса КЭ1 с *n*-НФА. Голубым показана ячейка для молекулярно-динамических расчётов, лентами — фермент, линиями — молекулы воды, сольватирующие фермент и включенные в КМ/ММ модель. Квантовая подсистема КМ/ММ модели (справа). Аминокислотные остатки показаны стержнями, *n*-НФА — шаростержневой моделью. Здесь и далее зелёным — углерод, красным — кислород, белым — водород и синим — азот.

Оценка стандартной энергии Гиббса связывания *n*-НФА в активном центре КЭ1 составила -7,2 ккал/моль по данным молекулярного докинга. Данное значение может быть преобразовано в константу диссоциации комплекса по уравнению (формула 1):

$$\Delta G^{\circ}_{\text{дисс}} = -RT \cdot \ln K_{\text{дисс}} \quad (1).$$

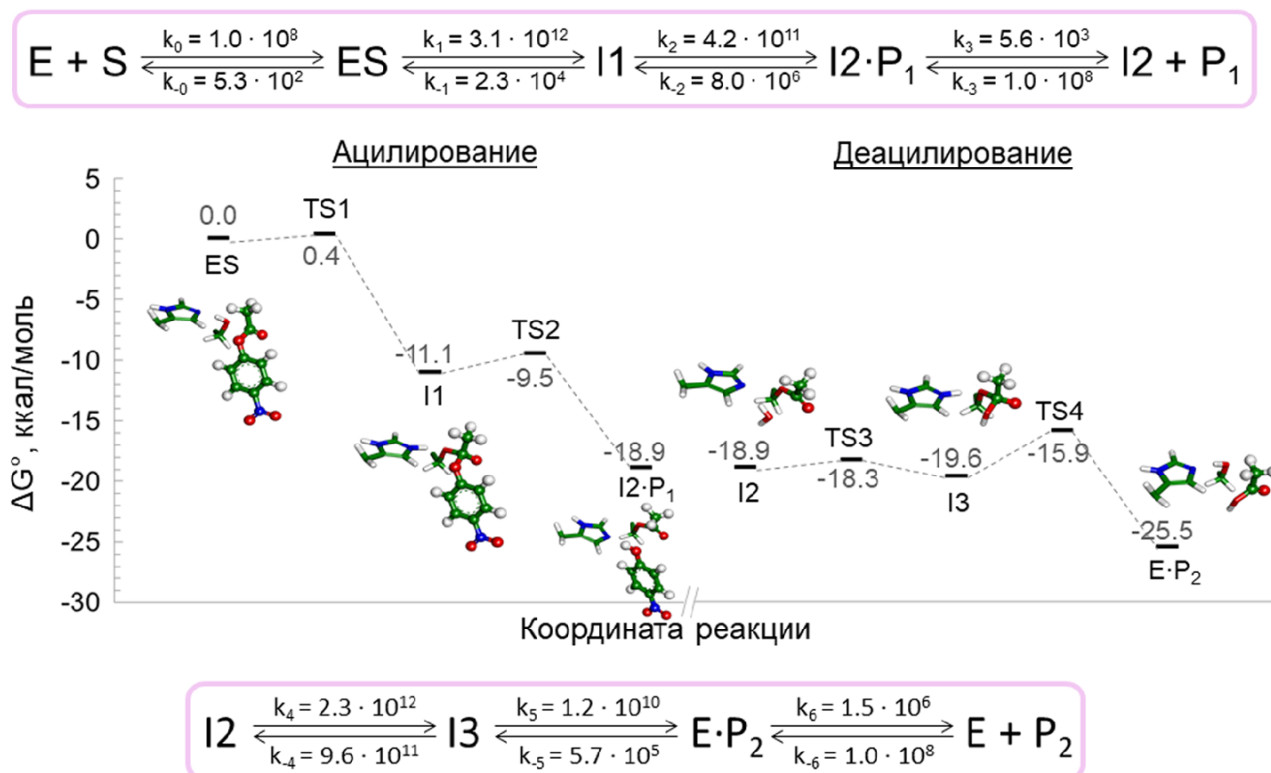
Значение константы диссоциации для комплекса *n*-НФА и КЭ1 составило 5,2 мкМ при  $T=298$  К.

Профиль поверхности потенциальной энергии был построен методом КМ/ММ. На его основе путём учёта энтропийного и энтальпийного вкладов в энергию был рассчитан профиль энергии Гиббса химической стадии реакции гидролиза (рис. 2). Согласно результатам моделирования, данный процесс состоит из четырёх элементарных стадий, первые две относятся к процессу ацилирования, последние две — к деацилированию. Реакция начинается с нуклеофильной атаки углерода сложноэфирной группы *n*-НФА атомом кислорода Ser221 с образованием тетраэдрического интермедиата II. При этом происходит перенос протона Ser221 на следующего участника каталитической триады His468, стабилизированного Glu354. Эта стадия происходит практически безбарьерно. Далее происходит разрыв С-О связи сложноэфирной группы *n*-НФА, сопряжённый с переносом протона с His468, и образуется свободный *para*-нитрофенол. Энергетический барьер второй стадии — 1,6 ккал/моль. Образовавшийся ацилфермент КЭ1 на третьей стадии подвергается нуклеофильной атаке молекулой воды с образованием тетраэдрического интермедиата III. Энергетический барьер третьей стадии — 0,6 ккал/моль. На последней стадии реакции происходит перенос протона с образованием регенерированного фермента и продукта реакции — уксусной кислоты. Данная стадия обладает наибольшим энергетическим барьером — 3,7 ккал/моль.

Полный профиль энергии Гиббса процесса гидролиза *n*-НФА карбоксилэстеразой составляли с учётом химической и диффузионной стадий реакции. Энергия Гиббса стадии образования фермент-субстратного комплекса и процессов выхода продуктов в раствор оценивали с помощью молекулярного докинга. Оценка стандартной энергии Гиббса выхода *para*-нитрофенола и уксусной кислоты в раствор приводит к величинам -5,8 ккал/моль и -2,5 ккал/моль соответственно.

На основании полученного профиля стандартной энергии Гиббса с использованием теории переходного состояния были оценены константы скорости всех элементарных стадий реакции (рис. 2). Константы скоростей бимолекулярных реакций образования комплекса были оценены как типичные значения константы скорости процессов, контролируемых диффузией.

Численное решение системы дифференциальных кинетических уравнений с начальными условиями, аналогичными экспериментальным данным, позволило оценить начальные скорости ферментативной реакции при разных исходных концентрациях субстрата. На основе полученной зависимости были рассчитаны значения  $K_M=91$  мкМ и  $k_{\text{cat}}=3 \cdot 10^5$  с<sup>-1</sup>. Для сопоставления с имеющимися экспериментальными данными максимальную скорость разделили на концентрацию фермента и его молекулярную массу (58,6 кДа) и получили значение  $V_{\text{max}}=30230$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> белка. Экспериментальное значение константы Михаэлиса находится в микромолярном диапазоне и составляет  $106,6 \pm 10,1$  мкМ, а значение  $V_{\text{max}}=493,9 \pm 14,3$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> белка [4]. Несмотря на столь заметное отличие рассчитанной величины  $V_{\text{max}}$  от экспериментального значения, различия между теорией и экспериментом в данном случае не драматичны. Частично эти различия обусловлены погрешностями оценок константы



**Рисунок 2.** Профиль энергии Гиббса реакции гидролиза *n*-НФА, полученный методом КМ(РВЕ0/6-31G\*\*)/MM(AMBER). Кинетическая схема реакции гидролиза *n*-НФА в активном центре КЭ1 для стадии ацилирования (сверху) и деацилирования (снизу). Все константы скоростей элементарных стадий представлены в с<sup>-1</sup>, константы  $k_0$ ,  $k_{-3}$ ,  $k_{-6}$  измеряются в л/(моль·с).

скорости — результаты расчёта в 60 раз превышают значение  $k_{cat}$ . На энергетической шкале это различие соответствует погрешности определения барьеров на профиле реакционного пути около 2,5 ккал/моль при комнатной температуре. С точки зрения приложения квантово-химических расчетов это укладывается в коридор ошибок, оцененный в работе по систематической оценке ошибок различных функционалов метода Кона-Шэма [19]. Также следует отметить, что при описании реакционного пути на поверхности потенциальной энергии не учитывается существование равновесия между реакционными и нереакционными состояниями, что также эффективно завышает константы скорости [20]. Согласно расчётам, проведенным методом молекулярной динамики, доля реакционных конформаций может составлять десятые и сотые доли в зависимости от конкретного субстрата [21]. Кроме того, отметим, что величина  $K_M$ , полученная в расчёте, совпадает с экспериментальной.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

С использованием комбинированного метода КМ/ММ построен энергетический профиль химической стадии реакции гидролиза *para*-нитрофенилацетата в активном центре КЭ1 человека. Энергии

связывания субстрата и диссоциации продуктов реакции из активного центра фермента оценены с использованием метода молекулярного докинга. На основе полученных данных построена и численно решена система дифференциальных кинетических уравнений, позволившая оценить значения  $V_{max}$  и  $K_M$ . Завышенное значение величины  $V_{max}$  может быть связано с упрощённым моделированием процесса связывания. Расположение активного центра на дне узкого канала позволяет предположить, что стадии попадания субстрата в активный центр или выход продуктов реакции в раствор будут являться скоростью-определяющими, и оценка констант бимолекулярных реакций через диффузионный предел приводит к завышенным величинам кинетических параметров. Использованный в данной работе метод молекулярного докинга позволяет оценить только энергию связывания субстрата или продуктов с ферментом, но не учитывает процесс их попадания в активный центр.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова [22].

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-29-13006).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Potter P., Wadkins R. (2006) *Curr. Med. Chem.*, **13**(9), 1045-1054.
2. Wang D., Zou L., Jin Q., Hou J., Ge G., Yang L. (2018) *Acta Pharm. Sin. B*, **8**(5), 699-712.
3. Casey Laizure S., Herring V., Hu Z., Witbrodt K., Parker R.B. (2013) *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.*, **33**(2), 210-222.
4. Zhu H.-J., Patrick K.S., Yuan H.-J., Wang J.-S., Donovan J.L., de Vane C.L., Malcolm R., Johnson J.A., Youngblood G.L., Sweet D.H., Langaee T.Y., Markowitz J.S. (2008) *Am. J. Hum. Genet.*, **82**(6), 1241-1248.
5. Chanda S.M., Mortensen S.R., Moser V.C., Padilla S. (1997) *Toxicol. Sci.*, **38**(2), 148-157.
6. Kisan B., Rajini P.S., Shivaya S., Joshi A.K., Shruthi N.K. (2015) *Appl. Biol. Res.*, **17**(3), 273-279.
7. Bencharit S., Edwards C.C., Morton C.L., Howard-Williams E.L., Kuhn P., Potter P.M., Redinbo M.R. (2006) *J. Mol. Biol.*, **363**(1), 201-214.
8. Word J.M., Lovell S.C., Richardson J.S., Richardson D.C. (1999) *J. Mol. Biol.*, **285**(4), 1735-1747.
9. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. (2009) *J. Comput. Chem.*, **30**(16), 2785-2791.
10. Neese F. (2012) *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, **2**(1), 73-78.
11. Yu W., He X., Vanommeslaeghe K., MacKerell A.D. (2012) *J. Comput. Chem.*, **33**(31), 2451-2468.
12. Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., Kundu S., Zhong S., Shim J., Darian E., Guvench O., Lopes P., Vorobyov I., Mackerell A.D. (2009) *J. Comput. Chem.*, **31**, 671-690.
13. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. (1983) *J. Chem. Phys.*, **79**(2), 926-935.
14. Valiev M., Bylaska E.J., Govind N., Kowalski K., Straatsma T.P., van Dam H.J.J., Wang D., Nieplocha J., Apra E., Windus T.L., de Jong W.A. (2010) *Comput. Phys. Commun.*, **181**(9), 1477-1489.
15. Adamo C., Barone V. (1999) *J. Chem. Phys.*, **110**, 6158-6170.
16. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5179-5197.
17. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996) *J. Mol. Graph.*, **14**, 33-38.
18. Abramnikov A.V. KINET, Software for Numerical Modeling Kinetics of Complex Chemical Reactions.
19. Mardirossian N., Head-Gordon M. (2017) *Mol. Phys.*, **115**(19), 2315-2372.
20. Khrenova M.G., Nemukhin A.V., Tsirelson V.G. (2020) *Mendelev Comm.*, **30**(5), 583-585.
21. Khrenova M.G., Tsirelson V.G., Nemukhin A.V. (2020) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **22**(34), 19069-19079.
22. Voevodin V.V., Antonov A.S., Nikitenko D.A., Shvets P.A., Sobolev S.I., Sidorov I.Y., Stefanov K.S., Voevodin V.V., Zhumatiy S.A. (2019) *Supercomput. Front. Innov.*, **6**(2), 4-11.

Поступила в редакцию: 20. 04. 2021.  
После доработки: 03. 05. 2021.  
Принята к печати: 11. 05. 2021.

## MOLECULAR MECHANISM OF CHROMOGENIC SUBSTRATE HYDROLYSIS IN THE ACTIVE SITE OF HUMAN CARBOXYLESTERASE-1

*A.M. Kulakova<sup>1,\*</sup>, M.G. Khrenova<sup>1,2</sup>, A.V. Nemukhin<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry,  
1 bldg 3, Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: kulakova@lcc.chem.msu.ru

<sup>2</sup>Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre  
“Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences,  
33 bldg 2, Leninsky ave., Moscow, 119071 Russia

<sup>3</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,  
4 Kosygina str., Moscow, 119334 Russia

Human carboxylesterases are involved in the protective processes of detoxification during the hydrolytic metabolism of xenobiotics. Knowledge of the molecular mechanisms of substrates hydrolysis in the enzymes active site is necessary for the rational drug design. In this work, the molecular mechanism of the hydrolysis reaction of *para*-nitrophenyl acetate in the active site of human carboxylesterase was determined using modern methods of molecular modeling. According to the combined method of quantum mechanics/molecular mechanics calculations, the chemical reaction occurs within four elementary steps, including two steps of the acylation stage, and two steps of the deacylation stage. All elementary steps have low energy barriers, with the gradual lowering of the intermediate energies that stimulates reaction in the forward direction. The molecular docking was used to estimate the binding constants of the enzyme-substrate complex and the dissociation constant of enzyme-product complexes. The effective kinetic parameters of the enzymatic hydrolysis in the active site of carboxylesterase are determined by numerical solution of the differential kinetic equations.

**Key words:** molecular modeling; quantum mechanics / molecular mechanics; molecular docking; carboxylesterase; hydrolysis

**Funding.** This work was funded by Russian Foundation for Basic Research (project no. 18-29-13006).

Received: 20.04.2021, revised: 03.05.2021, accepted: 11.05.2021.