

## МОДЕЛИРОВАНИЕ СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОСТИ ПЕНИЦИЛЛИНАМИДАЗЫ МЕТОДОМ ВОЗМУЩЕНИЯ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ

Зейфман А.А.<sup>1</sup>, Перепёлкин В.В.<sup>2</sup>, Новиков Ф.Н.<sup>1</sup>, Строганов О.В.<sup>1</sup>, Чилов Г.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ООО «Молекулярные Технологии», Москва, Россия (119992, ул. Ленинские Горы, д. 1, стр.75А)

<sup>2</sup>Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия (119991, ГСП-1., Ленинские Горы, д. 1, стр.3)

Предложен новый подход к моделированию стереоселективности ферментативных реакций, основанный на применении метода возмущения свободной энергии в молекулярно-динамических расчётах. Для определения соотношения скоростей превращения энантиомеров рассчитывается разница между свободными энергиями комплексов белок-субстрат для разных энантиомеров, а также разница между свободными энергиями переходных состояний, на основании чего определяется итоговое различие в свободных энергиях активации реакций. Энергетическое различие хиральных состояний определяется, в свою очередь, путём постепенного перевода хирального атома каждого из энантиомеров в плоское ахиральное состояние, идентичное для обоих энантиомеров. Разработанный подход позволяет явным образом учитывать все атомы белка и лиганда, а также молекулы растворителя, и, путём усреднения по набору термодинамических состояний системы, приводит к истинному значению разницы свободной энергии активации реакции для двух энантиомеров субстрата. Проведённая валидация метода по известным экспериментальным данным показала его способность не только качественно, но и количественно предсказывать энантиоселективность гидролиза хирального субстрата пенициллинамидазы 2-фенил-N-(1-фенетил)ацетамида. В сочетании с существующими методами моделирования структур мутантных форм фермента предложенный метод расчёта стереоселективности позволит проводить направленный дизайн новых эффективных биокатализаторов.

Ключевые слова: энантиоселективность, молекулярная динамика, метод возмущения свободной энергии.

## MODELING OF PENICILLINAMIDASE ENANTIOSELECTIVITY BY FREE ENERGY PERTURBATION

Zeifman A.A.<sup>1</sup>, Perepelkin V.V.<sup>2</sup>, Novikov F.N.<sup>1</sup>, Stroganov O.V.<sup>1</sup>, Chilov G.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LLC Molecular Technologies, Moscow, Russia (119992, Leninskie Gory 1, bldg. 75A)

<sup>2</sup>Chemistry Department, Moscow State University, Moscow, Russia (119991, Leninskie Gory 1, bldg. 3)

New free energy perturbation/molecular dynamics method for the calculation of enzymatic reactions enantioselectivity was proposed. Ratio of rate constants for two enantiomers is obtained by calculating free energy difference between initial enzyme-substrate complexes of both enantiomers and reaction transition states for both enantiomers, which together gives the difference in the activation energy. Free energy transition between enantiomers is achieved by planarizing the chiral carbon atoms. Proposed approach allows to account for all protein, solvent and ligand atoms and produces true free energy value due to averaging over the thermodynamic ensemble of states. It allowed not only to predict the direction of the enantioselectivity but gave numerical data which was in a good agreement with known experimental results for the hydrolysis of the chiral substrate by penicillinamidase - 2-phenyl-N-(1-phenethyl)acetamide. In conjunction with existing methods for modeling of mutant enzyme structures, proposed approach will allow for a straightforward design of novel efficient biocatalyzers.

Keywords: enantioselectivity, molecular dynamics, free energy perturbation.

### Введение

В последнее время большой интерес представляет разработка методов моделирования энантиоселективности мутантных форм ферментов, позволяющих значительно сократить объем экспериментальной работы при создании новых эффективных биокатализаторов с заданными свойствами. Наиболее часто для данных целей применяется метод молекулярного докинга [6], который характеризуется высокой производительностью, но сравнительно низкой точностью, обусловленной применением эмпирических силовых полей и недостаточной степенью сэмпирования степеней свободы системы. Более корректным и, как следствие,

точным методом моделирования является метод возмущения свободной энергии (ВСЭ), позволяющий использовать полноатомные модели белка и растворителя и проводить усреднение по большому количеству микросостояний системы. Данный метод основан на определении изменения свободной энергии при небольшом постепенном изменении моделируемой системы (например, замена метильной группы на этильную) в ходе молекулярной динамики. Потенциально он может быть применён и для расчёта энергии перехода энантиомерных соединений друг в друга (и, как следствие, расчёта энантиоселективности). Таким образом, создание нового высокоточного подхода к определению энантиоселективности *in silico* является востребованной и актуальной задачей.

В качестве объекта исследования была выбрана пенициллинацилаза (пенициллинацилаза, ПА) – фермент, который катализирует синтез и гидролиз амидных субстратов, и обладает стереоселективностью [2], что позволяет использовать её не только для синтеза промышленно важных пенициллинов, но и для разделения оптически активных субстратов [7]. ПА экспрессируется в бактерии *Escherichia coli*, что позволяет достаточно легко вводить в данный фермент те или иные мутации методами молекулярной биологии для улучшения различных каталитических свойств, в том числе стереоселективности, и нарабатывать данный фермент в значительных количествах [3].

В рамках выполнения настоящего исследования была проведена разработка и валидация методики компьютерного моделирования энантиоселективности пенициллинацилазы.

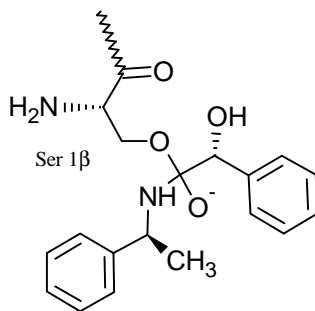
## Методы

**Подготовка полноатомной модели и топологического файла комплекса фермент - 2-фенил-N-(1-фенетил)ацетамид (ES).** Использовалась трёхмерная структура ПА из базы данных PDB (PDB ID 1GM9), трёхмерная структура энантиомеров 2-фенил-N-(1-фенетил)ацетамида подготавливалась с помощью программы ACD LABS 12 [1]. Для подготовки трёхмерной структуры комплекса проводился молекулярный докинг амидного субстрата в активный сайт фермента с помощью программы Lead Finder [9]. Лучшая поза отбиралась по результатам визуализации комплекса на основании наличия характеристичных водородных связей амидного азота субстрата с остатками Ala61 и Asn241 белка.

Для подготовки топологического файла силового поля OPLS-AA использовалась программа ACPYPE [8]. Окончательную трёхмерную структуру и топологический файл подготавливался с помощью программы *pdb2gmx* пакета Gromacs [10]. Для добавления молекул растворителя (вода TIP4P) использовалась программа *genbox* пакета *Gromacs*.

**Подготовка полноатомной модели и топологических параметров тетраэдрического интермедиата (рис. 1).** Использовалась трёхмерная структура ПА из базы данных PDB (PDB ID 1GM9), трёхмерная структура тетраэдрического интермедиата оптимизировалась с помо-

щью программы ACD LABS 12 [1]. Для подготовки структуры интермедиата проводится ковалентный докинг тетраэдрического интермедиата в активный сайт фермента с ковалентной привязкой атома OG серина 1  $\beta$ -цепи к «карбонильному» атому кислорода ацильного донора (в данном случае соединенному с атомом азота нуклеофила) с помощью программы Lead Finder [9]. Лучшая поза отбиралась по результатам визуализации комплекса на основании наличия водородных связей с остатками Ala61 и Asn241.

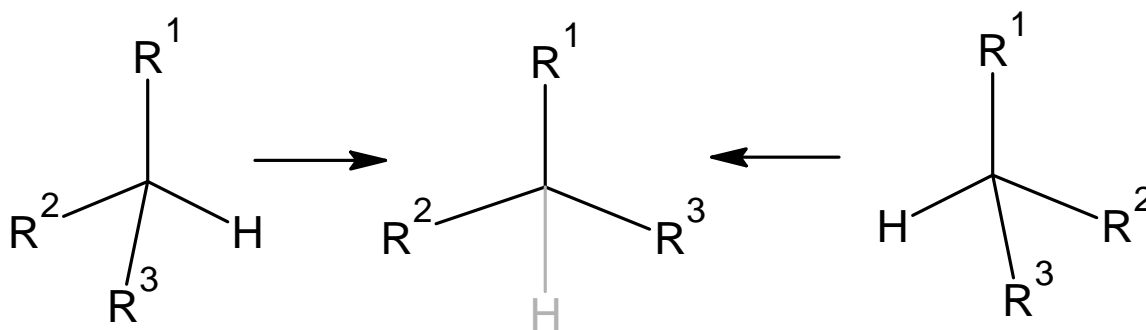


**Рисунок 1.** Структурная формула тетраэдрического интермедиата

Для подготовки топологического файла силового поля OPLS-AA использовалась программа АСРУРЕ [8]. Полученные топологические параметры (заряды и типы атомов, а также параметры связей и двугранных углов) вносились в файл *aminoacids.rtp*, используемый программным пакетом Gromacs [10] для определения параметров аминокислотных остатков. Дополнительно в файл *aminoacids.hdb* вносились изменения, необходимые для автоматического определения положения атомов водорода.

Окончательная трёхмерная структура и топологический файл тетраэдрического ацилфермент-нуклеофильного комплекса генерировались с помощью программы *pdb2gmx* пакета Gromacs. Для добавления молекул растворителя (вода TIP4P) использовалась программа *genbox* пакета Gromacs.

**Планирование энантиомеров комплексов методом ВСЭ.** Для определения разницы свободной энергии между двумя различными энантиомерами использовалась схема, отображенная на Рисунке 2.



**Рисунок 2.** Схема расчёта разницы свободной энергии энантиомеров методом ВСЭ.

Для превращения энантиомеров в ахиральное промежуточное состояние, отображенного на Рисунке 2, сначала приводился к нулю заряд на атоме водорода, а затем приводились к нулю Ван-дер-Ваальсовы параметры и валентные и двугранные углов, связанные с данным атомом водорода. Данная процедура проводилась для обоих энантиомеров комплекса белок-субстрат и тетраэдрического интермедиата.

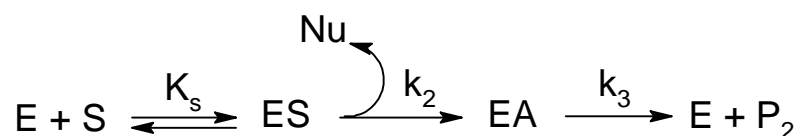
**Расчёты разницы свободной энергии энантиомеров методом ВСЭ.** Переход методом ВСЭ в каждом случае состоял из 10 равномерных шагов по  $\lambda$  и проводился по следующей схеме (длина шага 2 фс):

1. Минимизация структуры до градиента энергии 100 кДж/моль/нм (5000 шагов)
2. NVT - динамика (100 пс, 50000 шагов)
3. NPT - динамика (100 пс, 50000 шагов)
4. Итоговая NPT – динамика (2000 пс, 1000000 шагов)

Изменение свободной энергии рассчитывается при помощи утилиты *g\_bar*:

### Результаты и обсуждение

Катализ реакции гидролиза амидного субстрата под действием ПА включает стадию образования нековалентного комплекса ES, ковалентного тетраэдрического интермедиата (лимитирующая стадия для  $k_2$ ), отщепление нуклеофила с образованием ацилфермента и последующий гидролиз ацилфермента [5] (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** Кинетическая схема ПА-катализируемой реакции гидролиза амида. E – свободный фермент, S – амидный субстрат, Nu – нуклеофил (амин), P<sub>2</sub> – продукт реакции, образующийся при гидролизе ацилфермента (кислота), ES – фермент-субстратный комплекс, EA – ацилфермент

В случае одного ацильного донора P<sub>2</sub>, но различных нуклеофилов, энантиоселективность реакции гидролиза будет определяться отношением констант  $K_S$  и  $k_2$ . Отношения этих констант для двух энантиомеров могут быть рассчитаны методом возмущения свободной энергии. Итоговая энантиоселективность (для одинаковых начальных концентраций обоих энантиомеров) может быть рассчитана по формуле:

$$\frac{V_D}{V_L} = \frac{k_2^D K_S^L + [L]}{k_2^L K_S^L + [D]}$$

Согласно разработанной методике, рассчитываются энергии перехода каждого из энантиомеров комплекса фермент-субстрат и тетраэдрического интермедиата в тригональное

ахиральное состояние ( $\Delta G_{ncov}^{D \rightarrow trig}$ ,  $\Delta G_{ncov}^{L \rightarrow trig}$ ,  $\Delta G_{tetra}^{D \rightarrow trig}$ ,  $\Delta G_{tetra}^{L \rightarrow trig}$ ). На основе полученных значений отношение констант равновесия образования нековалентного комплекса  $K_N^L$  и  $K_N^D$  может быть определено согласно следующей формуле:

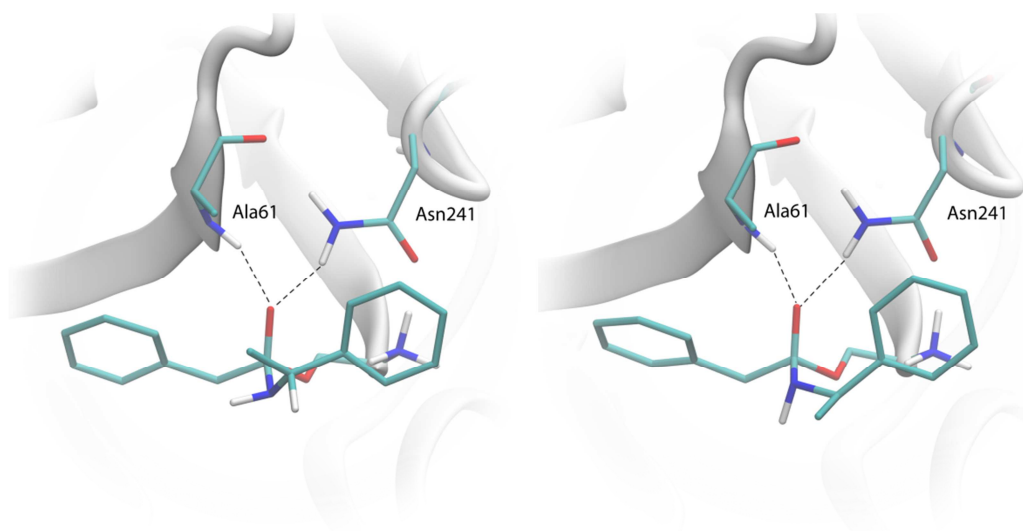
$$\frac{K_S^L}{K_S^D} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{ncov}^{L \rightarrow trig} - \Delta G_{ncov}^{D \rightarrow trig}}{RT}\right)$$

, поскольку энергии энантиомеров в растворе одинаковы.

Отношение констант скорости  $\frac{k_2^D}{k_2^L}$ , которое и характеризует стереоселективность реакции в условии насыщения субстратом, может быть оценено исходя из значения свободной энергии переходов для нековалентного комплекса и тетраэдрического интермедиата по следующей формуле:

$$\frac{k_2^D}{k_2^L} = \exp\left(-\frac{(\Delta G_{tetra}^{D \rightarrow trig} - \Delta G_{tetra}^{L \rightarrow trig}) - (\Delta G_{ncov}^{D \rightarrow trig} - \Delta G_{ncov}^{L \rightarrow trig})}{RT}\right)$$

Анализ молекулярно-динамических траекторий показал, что предложенный способ позволяет достичь перехода от D- и L- энантиомеров к планарному состоянию, как в случае исходного фермент-субстратного комплекса, так и в случае тетраэдрического интермедиата (рисунок 4). Использование протокола ВСЭ при этом позволило определить точное изменение свободной энергии в этих переходах, которое в свою очередь используется для расчёта энантиоселективности фермента.



**Рисунок 4.** Структура тетраэдрического интермедиата с 2-фенил-N-(1-фенил)ацетамидом: (D)-энантиомер (слева), планарное состояние (справа).

Подстановка результатов расчётов (таблица 1) в формулу для расчёта соотношения  $\frac{k_2^D}{k_2^L}$  приводит к энантиоселективности 1,79-2,88 с преобладанием L-изомера (разница в свободной энергии активации реакций в  $2000 \pm 590$  Дж/моль). Полученное направление селективности соответствует литературным данным, и достаточно хорошо количественно согласуется с ними (эксп. L/D = 10) [4].

**Таблица 1.** Итоговые значения свободных энергий тригонализации для гидролиза 2-фенил-N-(1-фенетил)ацетамида, кДж/моль.

1	$\Delta G_{ncov}^{trig,q}$	$\Delta G_{ncov}^{trig,VdW}$	$\Delta G_{tetra}^{trig,q}$	$\Delta G_{tetra}^{trig,VdW}$
D	-9,57±0,04	-25,84±0,28	-9,20± 0,23	-14,32±0,14
L	-8,75±0,20	-28,63±0,32	-8,59± 0,10	-15,02±0,20

## Выводы

Предложен новый высокоточный подход к моделированию энантиоселективности ферментативных реакций, основанный на расчёте изменения свободной энергии активации энантиомеров субстрата с помощью метода возмущения свободной энергии. Данный подход позволил явным образом учесть не только атомы реакционного центра, но и остальные атомы белка, а также молекулы растворителя, а также провести усреднение полученных значений энергии по термодинамическому ансамблю состояний системы. Применение подхода к расчёту энантиоселективности гидролиза 2-фенил-N-(1-фенетил)ацетамида пенициллинацилазой показало корректность предложенной схемы перехода, т.к. D- и L-энантиомеры субстрата и тетраэдрического интермедиата переходили в идентичное плоское состояние. Сопоставление полученных результатов с экспериментальными данными показало, что предсказанное направление энантиоселективности (L>D) является правильным, а степень его проявления удовлетворительно согласуется с экспериментом (2,3 – расчётное соотношение L/D, 10 – экспериментальное). В сочетании с методами моделирования структур мутантных ферментов данный подход может быть успешно использован для дизайна новых эффективных стереоспецифичных биокатализаторов.

*Работа была поддержана грантом Министерство образования и науки Российской Федерации (соглашение № 14.U02.21.1913 от 04 октября 2012 г.).*

## Список литературы

1. ACD/ChemSketch Freeware, version 12.00, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com), 2012. //
2. Akita H. [Natural products syntheses based on the biotransformation using biocatalyst] // Yakugaku Zasshi. 2011. T. 131. № 2. — С. 269-84.
3. Deaguero A.L., Blum J.K., Bommarius A.S. Improving the diastereoselectivity of penicillin G acylase for ampicillin synthesis from racemic substrates // Protein Eng Des Sel. 2012. T. 25. № 3. — С. 135-44.
4. Guranda D.T., van Langen L.M., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. Highly efficient and enantioselective enzymatic acylation of amines in aqueous medium // Tetrahedron: Asymmetry. 2001. T. 12. № 11. — С. 1645-1650.
5. Kasche V., Haufler U., Riechmann L. Kinetically controlled semisynthesis of beta-lactam antibiotics and peptides // Ann N Y Acad Sci. 1984. T. 434. — С. 99-105.
6. Li W., Liu C., Tan G., Zhang X., Zhu Z., Chai Y. Molecular Modeling Study of Chiral Separation and Recognition Mechanism of beta-Adrenergic Antagonists by Capillary Electrophoresis // Int J Mol Sci. 2012. T. 13. № 1. — С. 710-25.
7. Massolini G., Temporini C., Calleri E. Penicillin G acylase as chiral selector in LC and CE: exploring the origins of enantioselectivity // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2008. T. 875. № 1. — С. 20-9.
8. Sousa da Silva A.W., Vranken W.F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface // BMC Res Notes. 2012. T. 5. — С. 367.
9. Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. Lead finder: an approach to improve accuracy of protein-ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening // J Chem Inf Model. 2008. T. 48. № 12. — С. 2371-85.
10. Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J. GROMACS: fast, flexible, and free // J Comput Chem. 2005. T. 26. № 16. — С. 1701-18.

#### **Рецензенты:**

Шведас В.-Ю.К., д.х.н., профессора факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, г.Москва.

Анаников В.П., д.х.н., зав. лаб. металлокомплексных и наноразмерных катализаторов Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, г.Москва.