

# Tiocianāta un cilvēka ogļskābes anhidrāzes II mijiedarbības kvantu ķīmiskais pētījums

Mendels Fleišers<sup>1</sup>, Raivis Žalubovskis<sup>2</sup>, Andulis Šmidlers<sup>3</sup>, Daina Jansone<sup>4</sup>,  
<sup>1-4</sup>Latvijas Organiskās sintēzes institūts

**Kopsavilkums.** Lai noskaidrotu tiocianāta un CA II mijiedarbības mehānismu, veikta detalizēta kvantu ķīmiskā izpēte, izmantojot pusempīrisko PM6 metodi. Aktīvā centra modelis tika balstīts uz CA II struktūras kristalogrāfiskajiem datiem (PBP kods - 2CBA). Modelī tika iekļauti:  $Zn^{2+}$  katjons, kas ir saistīts ar OH<sup>-</sup> ligandu un triju histidīnu – His94, His96, His119 – atlikumu imidazolu gredzeniem; atlikumi Glu106, Thr199, Thr200, His107, Arg246, Asn244, Gln92 un 8 ūdens molekulas. Mijiedarbības pirmā stadija noris spontāni un tās gaitā notiek tiocianāta molekulas deprotonēšana un tiocianāta anjona (SCN<sup>-</sup>) veidošanās. Pēc ts pārvarēšanas cinka koordinācijas sferā noris ūdens molekulas aizvietošana ar tiocianāta anjonu SCN<sup>-</sup>. Līdzsvara stāvoklī saites Zn-N garums ir 1,844 Å, un atbilstošā saites kārta ir 0,639.

**Atslēgas vārdi:** ogļskābes anhidrāze II, tiocianāts, inhibitors, PM6 metode.

## I. IEVADS

Ogļskābes anhidrāzes (CA) ir cinku saturošie metaloenzīmi, kuri katalizē oglekļa dioksīda CO<sub>2</sub> atgriezenisku hidratāciju līdz bikarbonātam un protonam. Pašlaik visas CA iedala piecās klasēs ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  un  $\xi$ ).  $\alpha$ -Klases ogļskābes anhidrāzes sastopamas visos mugurkaulniekos, baktērijās, aļģēs un zaļo augu citoplazmā. Zīdītājiem ir pazīstamas  $\alpha$ -CA16 izoformas, kurām ir atšķirīga katalītiskā aktivitāte, intracelulāra lokalizācija un sadalījums organisma audos. Ogļskābes anhidrāzes ir iesaistītas vairākos fizioloģiskos un patoloģiskos procesos, ieskaitot arī elpošanu, CO<sub>2</sub> un bikarbonāta pārnesi starp metabolisma procesā esošajiem audiem un plaušām; vides pH un CO<sub>2</sub> homeostāzē, elektrolītu sekrēcijā dažādos audos un orgānos, biosintēzes reakcijas, onkoģenēzē utt. Šādā sakarā daudzas CA izoformas ir nozīmīgi terapeitiski mērķi ar potenciālu inhibēt vai ārstēt vairākas slimības, tostarp glaukomu, aptaukošanos, epilepsiju, osteoporozī, ļaundabīgos audzējus utt. Vismaz 25 klīniski pašlaik izmantojamiem preparātiem piemīt ievērojamas CA inhibējošas īpašības [1]. Pastāv divas galvenās inhibitoru klases: neaizvietotie sulfonamīdi un to bioizostēri un anjoni, kas veido kompleksus ar enzīma metālu. Šie inhibitori veido saiti ar  $Zn^{2+}$  jonu vai aizvieto cinka neproteīna ligandu. Pēdējos gados tiek veikti plaši pētījumi, lai atrastu jaunus un efektīvus inhibitorus dažādu klašu CA, tai skaitā starp neorganiskajiem joniem un mazām molekulām [2-4]. Tiocianāts kā potenciāls CA inhibitors ir pazīstams jau ilgāku laiku [5]. Attiecībā pret zīdītāju  $\alpha$ -CA izoformām, tiocianāta anjons uzrāda inhibējošas īpašības ar inhibīcijas konstanti diapazonā 0,010-39 mM. Cilvēka CA II gadījumā šī vērtība ir 1,6 mM [2].

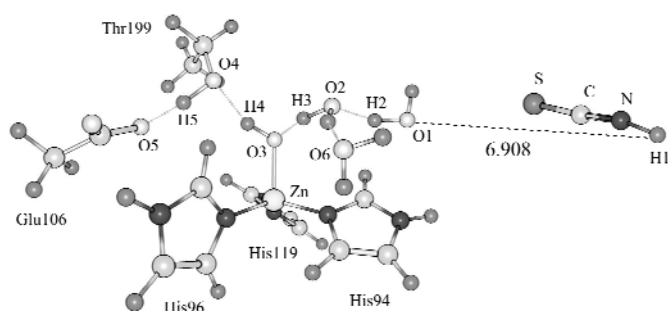
Enzīmu inhibitoru racionāla meklēšana prasa detalizētu informāciju par pētāmajiem objektiem. Līdzās datiem par potenciālā inhibitora iedarbības mērķa trīsdimensijas struktūras uzbūvi, svarīga nozīme ir ligandu un biomolekulu mijiedarbības mehānisma noskaidrošanai. Molekulārās sistēmas kvantu ķīmiskie aprēķini dod iespēju iegūt šo informāciju, kas nav eksperimentāli nosakāma tiešā veidā, piemēram, dati par aktivācijas enerģiju, pārejas stāvokli, struktūru un iespējamajiem starpproduktiem.

## II. MODEĻA IZVĒLE UN APRĒĶINU METODE

Ogļskābes anhidrāze II ir polipeptīdu ķēde no 260 aminoskābēm. Nesen, pētot tiocianāta hidratācijas mehānismu ar DFT metodi, tika izmantots CA II aktīvā centra vienkāršots modelis, kurā imidazola gredzenu vietā ir trīs amonjaka molekulas –  $[Zn(NH_3)_3OH]^+$  [6]. Mūsu gadījumā enzīma aktīvā centra modelis pamatojas uz CA II struktūras kristalogrāfiskajiem datiem (Protein Data Bank code - 2CBA [7]). Modelī tika iekļauti:  $Zn^{2+}$  katjons, kas ir saistīts ar OH<sup>-</sup> ligandu un trim histidīna atlikumiem His94, His96 un His119; Glu106, Thr199, Thr200, His107, Arg246, Asn244, Gln92 atlikumi un 8 ūdens molekulas – Wat264, Wat265, Wat292, Wat318, Wat338, Wat359, Wat369, Wat389. Kopējais atomu skaits sistēmā ir 243. (Skaidrības labad attēlos 1.-7. parādīti tikai tie sistēmas atomi, kuri ir tieši iesaistīti ķīmiskajās parvērībās. Attālumi un saišu garumi uzrādīti angstrēmos.) Kvantu ķīmiskie aprēķini veikti ar programmu MOPAC2009 [8], izmantojot nesen izstrādāto pusempīrisko metodi PM6 [9]. Kā rāda prakse, šī metode ar labu precizitāti reproducē vairākas olbaltumvielu īpašības, ieskaitot metaloproteīnus, enzīmu ģeometriju un aktīvo centru struktūru [10]. Aprēķini tika veikti ar molekulārās sistēmas visu ģeometrisku parametru pilnu optimizāciju, izmantojot programmas atslēgas vārdu PRECISE. Stacionāro punktu rakstura verifikācija (minimums/pārejas stāvoklis) tika veikta, analizējot svārstību frekvences. Reakcijas sistēmas datora dizains un *post-processing* vizualizācijā veikti, izmantojot programmatūru ChemCraft [11] un Jmol [12].

## III. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Modelējot mijiedarbības procesu starp CA un inhibitoru, sākuma stāvoklī attālums starp tiocianāta ūdeņraža atomu H1 un tuvākās ūdens molekulas (Wat359) atomu O1 ir 6,908 Å, bet attālums starp tiocianāta N atomu un enzīma cinka jonu – 11,269 Å (1. att.).

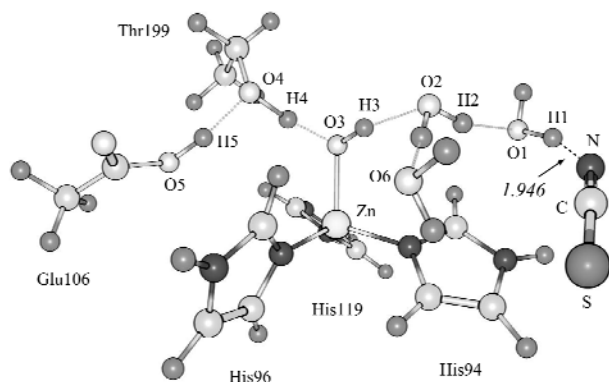


1. att. Sistēmas CA II-tiocianāts sākuma stāvoklis.

Reakcijas pirmā stadija notiek patvaļīgi (bez enerģētiskās barjeras pārvarēšanas). *Post-processing* vizualizācija rāda, ka tiocianāta molekula pakāpeniski tuvojas enzīmam. Kad attālums H1–O1 kļūst 1,827 Å, no ūdens molekulas Wat338, kurai ir ūdeņraža saite ar OH<sup>-</sup> ligandu, atšķēlas protons H3, kas īslaicīgi ieņem tiltveida pozīciju starp atomu O2 un OH<sup>-</sup> liganda skābekļa atomu O3. Attālumam O1–H1 samazinoties līdz 1,677 Å, no ūdens molekulas Wat359 (O1) atdalās protons H2, un vienlaicīgi tiltveida protons H3 pievienojas OH<sup>-</sup> ligandam, tādējādi pārvēršot to par ūdens molekulu. Pēc programmas dažiem optimizācijas soļiem no tiocianāta molekulas (HSCN) atdalās protons H1, kas pievienojas ūdens molekulas Wat359 skābekļa atomam O1. Atbilstoši aprēķiniem daļiņa SCN ir anjons – tās kopējais lādiņš ir -0,954.

Tālāk notiek sinhrona H5 protonu pārnese no Thr199 atlikuma uz atlikuma Glu106 karboksilgrupu, un protona H4 pārnese no cinka koordinētās ūdens molekulas uz atlikuma Thr199 skābekļa atomu O4 (2. att.). Kad sistēma ir sasniegusi līdzsvara stāvokli **m1**, svarīgākie attālumi ir šādi: O2–H3 = 1,829 Å, O3–H4 = 1,390 Å, O4–H5 = 1,513 Å, N–H1 = 1,946 Å un N–Zn = 5,878 Å. Šīs stadijas reakcijas siltums  $\Delta H_f = -23,7$  kcal/mol.

Tātad reakcijas pirmajā stadijā notiek spontāna tiocianāta molekulas deprotonēšana un tiocianāta anjona SCN<sup>-</sup> veidošanās. Protons pa ūdeņraža saišu tīklu tiek pārņemts uz telpiski attālināto nukleofilo atlikuma Glu106 karboksilgrupu.

2. att. Sistēmas līdzsvara stāvokļa **m1** struktūra.

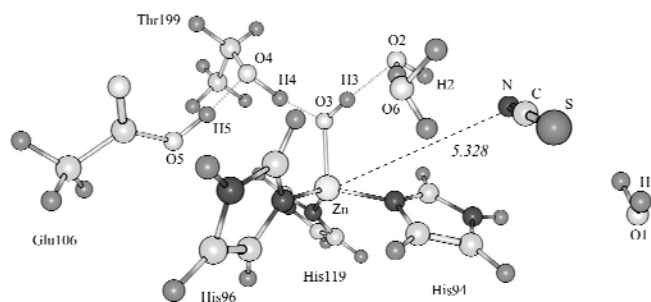
Jāatzīmē, ka aminoskābju atlikumu Glu106 un Thr199 piedalīšanās protona pārnesei tika konstatēta arī

kvantu ķīmiskajā pētījumā par CO<sub>2</sub> hidratācijas mehānismu [13].

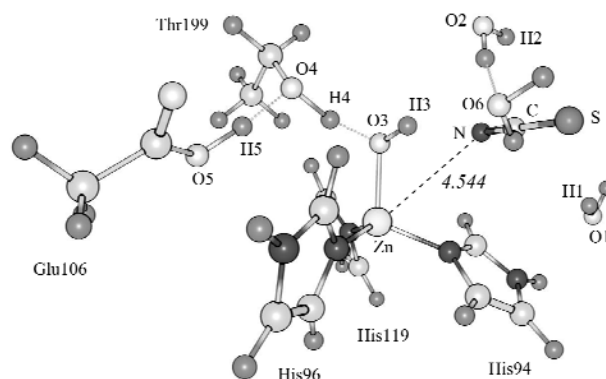
Turpmākie aprēķini tika veikti, izmantojot iekšējās reakcijas koordināti, par kuru tika izvēlēts attālums starp anjona SCN<sup>-</sup> slāpekļa un enzīma cinka atomiem, kā arī sedla punkta meklēšanas metodika SADDLE. Tika atrasti trīs pārejas stāvokļi (**ts**).

Pirmais pārejas stāvoklis **ts1** ir saistīts ar ūdeņraža saišu tīkla strukturālo reorganizāciju, ko izraisa SCN<sup>-</sup> anjona kustība cinka atoma virzienā: SCN<sup>-</sup> nobīda no sava ceļa ūdens molekulu Wat359 (O1). Šī procesa aktivācijas enerģija ir 3,5 kcal/mol. Pārejas stāvokli raksturo šādi attālumi starp atomiem: H2–N = 2,374 Å, H1–N = 2,166 Å, H3–O2 = 1,854 Å, H4–O3 = 1,436 Å, O3–Zn = 1,970 Å, N–Zn = 5,516 Å.

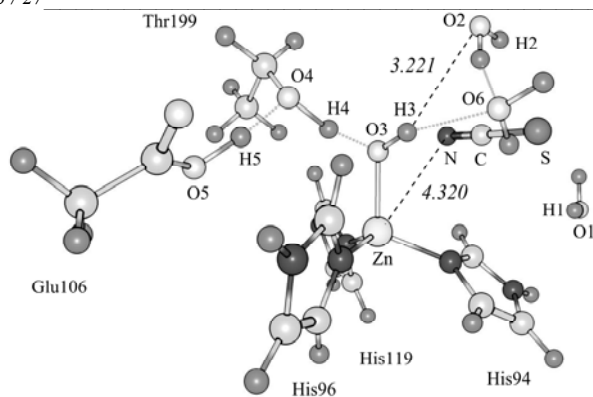
Kad sistēma ir sasniegusi atbilstošu līdzsvara stāvokli **m2**, ūdens molekula Wat359 (O1) atrodas jau aiz SCN<sup>-</sup> anjona, un attālums H1–N ir palielinājies līdz 3,827 Å (3. att.), bet attālums starp SCN<sup>-</sup> slāpekļa atomu un enzīma cinka atomu ir samazinājies līdz 5,328 Å.

3. att. Sistēmas līdzsvara stāvokļa **m2** struktūra.

Nākamais pārejas stāvoklis **ts2** ir saistīts ar ūdens molekulas Wat318 (O2), kurai ir ūdeņraža saite ar enzīma ligandu, aizvietošanu ar ūdens molekulu Wat292 (O6). Enerģijas barjeras augstums ir 4,8 kcal/mol. Pārejas stāvoklī attālumi starp atomiem ir šādi: H3–O6 = 2,196 Å, H3–O2 = 3,111 Å un N–Zn = 4,544 Å (4. att.).

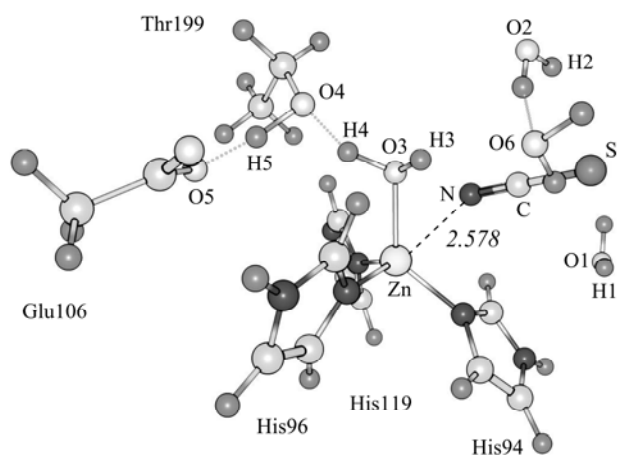
4. att. Sistēmas pārejas stāvokļa **ts2** struktūra.

Līdzsvara stāvoklī **m3**, kas seko aiz **ts2**, attālums H3–O2 palielinās līdz 3,221 Å, bet attālums H3–O6 samazinās līdz 2,149 Å. Attālums starp SCN<sup>-</sup> slāpekļa atomu un enzīma cinka atomu samazinās līdz 4,320 (5. att.).

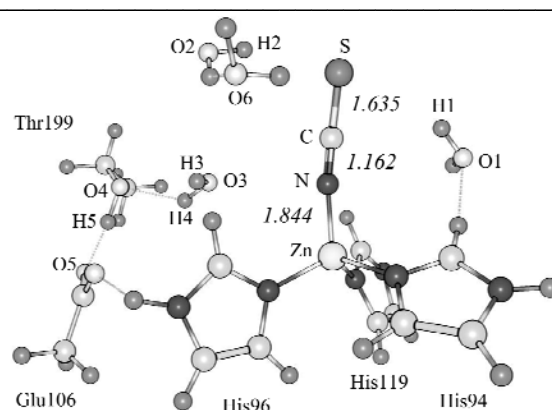
5. att. Sistēmas līdzsvara stāvokļa **m3** struktūra.

Tālāka anjona  $\text{SCN}^-$  tuvošanās cinka atomam reakcijas sistēmā izraisa reversu divu protonu pānesi. Pārejas stāvoklim **ts3** raksturīga augstāka aktivācijas enerģija, salīdzinot ar **ts1** un **ts2**, un tā ir 8,2 kcal/mol. Kā redzams 6. att.,  $\text{OH}^-$  ligands ir pārvērties par ūdens molekulu reversā protona H4 pāneses rezultātā no Thr199 atlikuma uz liganda skābekļa atomu O3. Vienlaicīgi notikusi protona H5 pānese no Glu106 atlikuma uz Thr199 atlikuma skābekļa atomu O4. Attālums  $\text{Zn}-\text{O3}$ , salīdzinot ar līdzsvara stāvokli **m3**, ir palielinājies no 1,951 Å līdz 2,087 Å, un tam atbilstošā saites kārtā ir samazinājies no 0,573 līdz 0,404. Tas liecina, ka saite starp ligandu un enzīmu ir kļuvusi jūtami vājāka. Attālums  $\text{Zn}-\text{N}$  ir 2,578 Å.

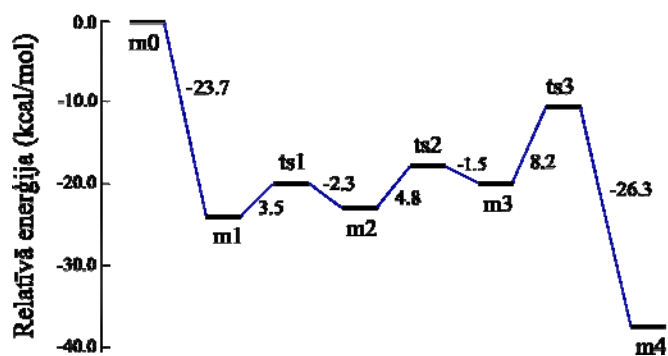
Tādējādi šie dati liecina par aminoskābju Glu106 un Thr199 atlikumu izšķirošo lomu protona pānesē ar zemām enerģijas barjerām no tiocianāta molekulas uz enzīma ligandu. Šīs reakcijas stadijas siltums, izejot no **ts3** stāvokļa, ir -26,3 kcal/mol.

6. att. Sistēmas pārejas stāvokļa **ts3** struktūra.

Pēc sedla punkta pārvarēšanas cinka koordinācijas sfērā notiek ūdens molekulas aizvietošanas process ar  $\text{SCN}^-$ . Relaksētā stāvoklī **m4** (7. att.) ūdens molekula (O3) atrodas no cinka atoma ievērojamā attālumā, kas vienāds ar 4,306 Å, un jaunizveidotās  $\text{Zn}-\text{N}$  saites garumus ir 1,844 Å.

7. att. Sistēmas līdzsvara stāvokļa **m4** struktūra.

Iegūtie rezultāti par enzīma fiksētā  $\text{SCN}^-$  ģeometriju labi sakrīt ar eksperimentālajiem kristalogrāfiskajiem datiem [14]:  $\text{Zn}-\text{N} = 1,907$  Å,  $\text{N}-\text{C} = 1,269$  Å,  $\text{C}-\text{S} = 1,538$  Å.



8. att. Tiocianāta un CA II mijiedarbības potenciālās enerģijas diagramma.

Pētāmās reakcijas enerģijas profils ir parādīts 8. att. Sistēmas sākotnējā stāvokļa **m0** enerģija ir izolētā ogļskābes anhidrāzes modeļa un brīvas tiocianāta molekulas rašanās siltumu summa. Reakcija ir eksotermiska. Enerģijas izmaiņa sistēmā starp sākotnējo stāvokli **m0** un galīgo stāvokli **m4** ir 37,1 kcal/mol, kas liecina par enzīmātiskās reakcijas produkta izteiktu stabilitāti. Saites  $\text{Zn}-\text{N}$  kārtā ir 0,639. Spriežot pēc tās lieluma, var secināt, ka saitei starp inhibitoru un enzīmu nav kovalenta daba.

#### IV. SECINĀJUMI

Veikts teorētisks pētījums par tiocianāta un cilvēka ogļskābes anhidrāzes II mijiedarbības mehānismu. Enzīma aktīvā centra modelis bija balstīts uz CA II struktūras kristalogrāfiskajiem datiem. Reakcijas ceļā lokalizēti un raksturoti trīs pārejas un četri līdzsvara stāvokļi, kā rezultātā iegūts reakcijas enerģijas profils.

Konstatēts, ka reakcijas pirmā stadija noris spontāni un tās rezultātā deprotonējas tiocianāta molekula, un rodas  $\text{SCN}^-$  anjons. Protons pa ūdeņraža saišu tīklu, kurā ietilpst ūdens molekulas Wat359 un Wat338, hidroksīda ligands, kā arī Thr199 atlikums, tiek pārnests uz telpiski attālināto nukleofilo Glu106 atlikuma karboksilgrupu. Šīs reakcijas stadijas siltums ir -23,7 kcal/mol. Ūdens molekulu un strukturāli kustīgo ūdeņraža saišu klātbūtne enzīma aktīvajā centrā

nodrošina zemas aktivācijas barjeras,  $\text{SCN}^-$  anjonam tuvojoties  $\text{Zn}^{2+}$  kofaktoram.

Pēdējā reakcijas stadija ir ūdens molekulas aizvietošana cinka koordinācijas sfērā ar tiocianāta anjonu  $\text{SCN}^-$ . Reakcija kopumā ir eksotermiska, un tas liecina, ka tiocianāts ir potenciāls CA II enzīma inhibitors.

Veiktais kvantu ķīmiskais pētījums dod pilnīgāku priekšstatu par tiocianāta molekulas un CA II aktīvā centra mijiedarbības molekulāro mehānismu, un tas var būt noderīgs, pētot citu strukturāli homologisko ogļskābes anhidrāžu izoformu katalītiskās īpašības.

### PATEICĪBA

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā Fonda atbalstu projektā No. 2009/0203/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/023.

### LITERATŪRAS SARAKSTS

- [1] C. T. Supuran. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008, 7, 168-181.
- [2] G. De Simone, C. T. Supuran. (In)organic anions as carbonic anhydrase inhibitors. *J. Inorg. Biochem.* 2012, 111, 117-129.
- [3] P. Burghout, D. Vullo, A. Scozzafava, P. W. M. Hermans, C. T. Supuran. Inhibition of the  $\beta$ -carbonic anhydrase from *Streptococcus pneumoniae* by inorganic anions and small molecules: Toward innovative drug design of anti-infectives? *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 243-248.
- [4] A. Innocenti, M. Hilvo, S. Parkkila, A. Scozzafava, C. T. Supuran. Carbonic anhydrase inhibitors: The membrane-associated isoform XV is highly inhibited by inorganic anions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 1155-1158.
- [5] H. W. Davenport. The inhibition of carbonic anhydrase and of gastric secretion by thiocyanate. *Am. J. Physiol.* 1940, 129, 505-514.
- [6] W. A. Eger, B. O. Jahn, E. Anders. The zinc complex catalyzed hydration of alkyl isothiocyanates. *J. Mol. Model.* 2009, 15, 433-446.
- [7] K. Hakansson, M. Carlsson, L. A. Svensson, A. Liljas. Structure of native and apo carbonic anhydrase II and structure of some of its anion-ligand complexes. *J. Mol. Biol.* 1992, 227, 1192-1204.
- [8] J. J. P. Stewart. Program package MOPAC2009. <http://OpenMOPAC.net>
- [9] J. J. P. Stewart. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification for NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* 2007, 13, 1173-1213.
- [10] J. J. P. Stewart. Application of the PM6 method to modeling proteins. *J. Mol. Model.* 2009, 15, 765-805.
- [11] ChemCraft program. <http://chemcraft.boom.ru>.
- [12] Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. <http://www.jmol.org>.
- [13] A. Bottoni, C. Z. Lanza, G. P. Miscione, D. Spinelli. New Model for a Theoretical Density Functional Theory Investigation of the Mechanism of the Carbonic Anhydrase: How Does the Internal Bicarbonate Rearrangement Occur? *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 1542-1550.
- [14] A. E. Eriksson, P. M. Kylsten, T. A. Jones, A. Liljas. Crystallographic studies of inhibitor binding sites in human carbonic anhydrase II: a pentacoordinated binding of the  $\text{SCN}^-$  ion to the zinc at high pH. *Proteins.* 1988, 4, 283-293.

**Mendel Fleisher**, *Dr. Chem.*, Principal Scientist at the Laboratory of Catalytic Synthesis, Latvian Institute of Organic Synthesis. Research interests: applied quantum chemistry, investigation of chemical reactions mechanisms. Address: 21 Aizkraukles Str., Riga, LV-1006, Latvia. E-mail: [misha@osi.lv](mailto:misha@osi.lv).

**Raivis Zalubovskis**, *Dr. Chem.*, Principal Scientist at the Latvian Institute of Organic Synthesis. Address: 21 Aizkraukles Str., Riga, LV-1006, Latvia. E-mail: [raivis@osi.lv](mailto:raivis@osi.lv).

**Andulis Shmidlers**, Research Associate at the Laboratory of Membrane Active Compounds and  $\beta$ -diketones, Latvian Institute of Organic Synthesis. Address: 21 Aizkraukles Str., Riga, LV-1006, Latvia. E-mail: [smidlers@osi.lv](mailto:smidlers@osi.lv).

**Daina Jansone**, *Dr. Chem.*, Research Scientist at the Modern Catalysis Method Group, Latvian Institute of Organic Synthesis. Address: 21 Aizkraukles Str., Riga, LV-1006, Latvia. E-mail: [jansone@osi.lv](mailto:jansone@osi.lv).

### Mendel Fleisher, Raivis Zalubovskis, Andulis Shmidlers, Daina Jansone. Quantum Chemical Investigation of the Interaction between Thiocyanate and the Human Carbonic Anhydrase II

In order to investigate the interaction mechanism of thiocyanate with CA II, a detailed quantum chemical study using the semiempirical PM6 method was carried out. The model system used in these calculations was based on the crystal structure of human CA (PDB code – 2CBA). This system included a  $\text{Zn}^{2+}$  cation bonded to a  $\text{HO}^-$  group and three histidine residues: His94, His96, and His119; the following residues: Glu106, Thr199, Thr200, His107, Arg246, Asn244, Gln92, and also 8 water molecules (Wat264, Wat265, Wat292, Wat318, Wat338, Wat359, Wat369, Wat389). The first step of the interaction of thiocyanate and CA occurred spontaneously with the heat of reaction  $\Delta H = -23.7$  kcal / mol. As a result of this process, the proton left the thiocyanate, there was  $\text{SCN}^-$  anion formation, and proton transfer occurred through the hydrogen-bond network to the oxygen atom of residue Glu106. Further, three transition states (TS) were found. The first of these states had the activation energy  $E_a = 3.5$  kcal / mol, and was related to the repulsion of the water molecule Wat359 from the path of the anion. The second TS occurred, when the water molecule Wat318, linked by a hydrogen bond to the hydroxyl group bonded to  $\text{Zn}^{2+}$ , was replaced with the molecule Wat292. The activation energy for this process  $E_a = 4.8$  kcal / mol. The third TS could be characterized by the highest activation energy, equal to 8.2 kcal / mol. In this case, the hydroxyl group bonded to  $\text{Zn}^{2+}$  was converted into a water molecule as a result of back transfer of a proton from the residue Thr199. After overcoming this TS, in the zinc coordination sphere there was the process of replacing the water molecule with the  $\text{SCN}^-$  anion. In the equilibrium state, the Zn–N bond length was equal to 1.844 Å, and the appropriate bond order was equal to 0.639. The computational results provided a better understanding of the molecular interaction between the thiocyanate inhibitor and the CA II enzyme.

### Мендель Флейшер, Райвис Жалубовскис, Андулис Шмидлерс, Дайна Янсоне. Квантово-химическое исследование взаимодействия тиоцианата с карбоангидразой II человека

С целью изучения механизма взаимодействия тиоцианата с КА II проведено детальное квантово-химическое исследования с использованием полупирического метода PM6. Модель активного центра энзима была построена на основе имеющихся кристаллографических данных структуры КА II (код PDB – 2CBA). В модель были включены:  $\text{Zn}^{2+}$  катион, связанный с  $\text{OH}^-$  группой и тремя имидазольными кольцами трех гистициновых остатков His94, His96 и His119; остатки Glu106, Thr199, Thr200, His107, Arg246, Asn244, Gln92, а также 8 молекул воды – Wat264, Wat265, Wat292, Wat318, Wat338, Wat359, Wat369, Wat389. Первая стадия взаимодействия тиоцианата с КА протекает самопроизвольно с теплотой реакции  $\Delta H = -23.7$  ккал/моль. Этот процесс приводит к депротонированию тиоцианата и образованию аниона  $\text{SCN}^-$ . Протон по сети водородных связей переносится к пространственно удаленной нуклеофильной карбоксильной группе резидия Glu106. Далее были локализованы три переходных состояния (ПС). Первое из них имеет энергию активации  $E_a = 3.5$  ккал/моль, и связано с отеснением молекулы воды Wat359 с пути аниона.

2013 / 27

Следующее ПС имеет энергию активации  $E_a=4.8$  ккал/моль и обусловлено процессом замещения молекулы воды Wat318, связанной Н-связью с гидроксильным лигандом, молекулой воды Wat292. Последнее переходное состояние характеризуется наибольшей энергией активации, равной 8.2 ккал/моль. При этом гидроксильный лиганд превращается в молекулу воды в результате обратного переноса протона от резидия Thr199. После преодоления системой этого ПС в координационной сфере цинка происходит процесс замещения молекулы воды анионом  $SCN^-$ . В равновесном состоянии длина связи Zn–N равна 1.844 Å, а соответствующий порядок связи составляет 0.639. Полученные данные дают более полное представление о молекулярном механизме взаимодействия ингибитора тиоцианат с КА II энзимом.