

Bioquímica computacional: una potente herramienta para desvelar el origen de la reactividad enzimática

Vicent Moliner

Resumen: En este artículo se presenta un resumen sobre las posibilidades que ofrece la química computacional en el ámbito de la reactividad química en sistemas biológicos. Basado en estudios teóricos QM/MM llevados a cabo en nuestro laboratorio, se muestran algunos ejemplos de reacciones enzimáticas con diferentes objetivos, desde desvelar el origen de su extraordinario poder catalítico hasta aplicaciones en el diseño de inhibidores o de nuevos biocatalizadores. Los primeros tendrán una aplicación en la síntesis de fármacos más potentes y selectivos, mientras que nuevos biocatalizadores pueden tener un gran impacto en muchos sectores de la industria.

Palabras clave: Catálisis Enzimática, Dinámica Molecular, Superficies de Energía Libre, QM/MM, Simulaciones Teóricas.

Abstract: This article presents a summary of the possibilities offered by computational chemistry in the field of the chemical reactivity in biological systems. Based on QM/MM theoretical studies carried out in our laboratory, several examples of enzymatic reactions with different objectives are shown, from revealing the origin of their extraordinary catalytic power to applications in the design of inhibitors or biocatalysts. The former will have an application in the synthesis of more potent and selective drugs, while new biocatalysts can have a great impact on many sectors of the industry.

Keywords: Enzyme Catalysis, Molecular Dynamics, Free Energy Surfaces, QM/MM, Theoretical Simulations.

INTRODUCCIÓN

El conjunto de reacciones químicas responsables de la vida en los organismos se conoce como metabolismo. Éstas, casi en su totalidad, necesitan ser catalizadas para que sucedan a velocidades lo suficientemente rápidas. Por ejemplo, un pecio de madera antiguo puede persistir durante siglos en el fondo del mar debido al hecho de que la hidrólisis de los enlaces glicosídicos de la celulosa requeriría varios millones de años. La misma reacción tiene lugar en escalas de tiempo de minutos en el aparato digestivo de los rumiantes gracias a la presencia de un bio-catalizador, denominado “enzima” desde finales del siglo XIX. Así, las enzimas pueden acelerar las reacciones químicas en varios órdenes de magnitud, posibilitando que tengan lugar de 10^6 a 10^{20} veces más rápido, lo que les convierte en catalizadores muy

eficientes. No obstante, en muchas ocasiones muestran otras ventajas tal vez más interesantes con respecto a los catalizadores no naturales como son la elevada quimio, regio y estereo-selectividad que son capaces de conseguir en las reacciones que catalizan. Estas características, junto a la ausencia de productos secundarios no deseados, la disminución de pasos que consumen energía (como la separación y purificación de intermedios) y su actividad en condiciones suaves de temperatura o presión justifican el creciente interés en comprender y aplicar biocatalizadores en la producción de productos químicos. Los procesos bioquímicos naturales en los organismos vivos son, por tanto, una fuente importante de inspiración para el diseño de nuevos biocatalizadores con potenciales aplicaciones en la industria, como se muestra en un volumen temático sobre “Biotálisis en la Industria” publicado recientemente en la revista *Chemical Review*.^[1] Obviamente, las enzimas son excelentes candidatos para cumplir con los requisitos de la industria pero, para extender su aplicabilidad a diferentes propósitos, necesitamos una comprensión más profunda de su forma de acción. El diseño de nuevas enzimas proporciona una prueba rigurosa de nuestra comprensión de cómo funcionan las enzimas naturales y *viceversa*, el conocimiento de cómo funcionan las enzimas a nivel molecular puede ser la base de la ingeniería de proteínas. Por otro lado, dado que la mayoría de las reacciones que tienen lugar en los organismos vivos utilizan enzimas para acelerarlas, se puede utilizar el conocimiento de éstas para la síntesis de inhibidores específicos de enzimas responsables de, por ejemplo, la proliferación de células tumorales.



V. Moliner

Departament de Química Física i Analítica
Universitat Jaume I
Avenida de Vicent Sos Baynat, s/n, 12071, Castellón
C-e: moliner@uji.es / web: www.biocomp.uji.es

Recibido: 04/10/2019. Aceptado: 26/12/2019.

En otros casos, la deficiencia o una ausencia total de una enzima puede causar trastornos genéticos hereditarios o, al contrario, algunas enfermedades pueden ser causadas por una actividad excesiva de una enzima; por ejemplo, el exceso de actividad de ciertas cisteína proteasas da como resultado la degradación del tejido muscular y la proteólisis intracelular. Por lo tanto, las enzimas son objetivos muy atractivos en la química médica.^[2] No obstante, aunque numerosos estudios han proporcionado una comprensión sólida sobre algunos de los factores clave de estos biocatalizadores, guiando de esta manera el diseño de fármacos, el conocimiento sobre el origen de la eficiencia enzimática y la selectividad para catalizar reacciones químicas aún no es completo y continuamente se establecen controversias en la literatura sobre este tema.^[3,4,5,6,7,8]

A lo largo de los años se ha postulado una gran cantidad de propuestas para explicar la eficiencia catalítica de las enzimas. Entre ellas, la estabilización del estado de transición (TS) en un sitio activo pre-organizado parece ser la más aceptada. El postulado seminal de Pauling,^[9] que explica el origen de la actividad catalítica de las enzimas basado en la complementariedad entre el sitio activo de la enzima y la estructura del TS, se ha reformulado en términos de la estabilización electrostática que la proteína proporciona a las estructuras transitorias que aparecen durante la transformación de reactivos en productos y, en particular, al TS.^[3,4] Sin embargo, la proteína tiene que adoptar diferentes conformaciones desde la etapa de unión de los sustratos en el centro activo hasta la liberación de los productos, pasando por la/s etapa/s donde tienen lugar reacciones químicas. Obviamente, es necesario tener en cuenta y estudiar la flexibilidad de la proteína para comprender cómo evolucionó un determinado sitio activo durante millones de años para interactuar y estabilizar el TS de una reacción química, al mismo tiempo que también es capaz de acomodar estructuras de estados reactivos, posibles intermedios y de productos. Por lo tanto, las enzimas deben ser estables para retener su estructura tridimensional, pero deben ser lo suficientemente flexibles como para cambiar entre las diferentes conformaciones relevantes en cada paso del ciclo catalítico completo. Además, tal como muestra la Figura 1, la presencia de diferentes conformaciones en cualquiera de los estados a lo largo del proceso catalítico (inherente a sistemas con un número elevado de grados de libertad) es esencial para explicar algunos resultados experimentales, como la dependencia con la temperatura de los efectos isotópicos cinéticos (KIE, de sus siglas en inglés *Kinetic Isotope Effects*) o las diferencias significativas observadas en las constantes de velocidad medidas por espectroscopia de moléculas individuales.^[10] La presencia de una amplia distribución de conformaciones con diferencias significativas en sus energías también se ha constatado a partir de simulaciones teóricas en diferentes sistemas enzimáticos.^[11,12] En consecuencia, el estudio computacional de la reactividad enzimática debe considerar la presencia de interacciones sustrato-proteína derivadas de los efectos electrostáticos y no electrostáticos mediante métodos es-

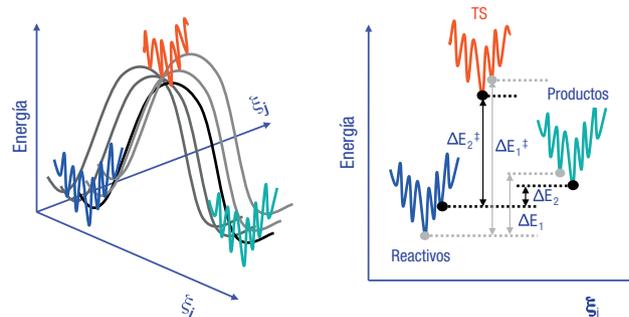


Figura 1. Representación esquemática de un perfil de energía potencial para un sistema de grandes dimensiones como las enzimas. ξ_1 y ξ_j representan la coordenada de reacción del sistema químico y la coordenada conformacional asociada a la proteína, respectivamente

taísticos capaces de explorar el espacio conformacional de cada estado implicado. El progreso en este campo ha sido extraordinario en las últimas décadas. Sin embargo, la falta de una comprensión detallada del vínculo entre secuencia, estructura, flexibilidad y función aún impide la comprensión completa de los procesos catalíticos enzimáticos y, por ende, las estrategias para diseñar nuevos biocatalizadores o nuevos inhibidores enzimáticos.

Con motivo del premio Nobel de Química de 2013, la Real Academia de Ciencias sueca publicó un artículo en el que se hacía hincapié en la relevancia del desarrollo y el uso de los métodos multi-escala que Martin Karplus, Michael Levitt y Arieh Warshel comenzaron a desarrollar en la década de los 70. El desarrollo de metodologías multi-escala o híbridas, que combinan la Mecánica Cuántica y la Mecánica Clásica (QM/MM de sus siglas en inglés *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*) ha permitido realizar avances considerables en la comprensión de los procesos biológicos, revelando detalles a nivel atómico de las reacciones enzimáticas. No menos importante, en el mismo artículo se incidía en como los métodos teóricos y las técnicas experimentales se fertilizan mutuamente.

Los métodos QM/MM permiten el estudio de procesos químicos, donde los electrones se describen explícitamente mediante un método cuántico (QM), interactuando con entornos complejos, que pueden simularse mediante el uso de campos de fuerza clásicos (MM). El resultado de la combinación de ambos potenciales proporciona una metodología lo suficientemente eficiente como para permitir un muestreo razonable del espacio configuracional en los estados relevantes de la reacción (un requisito para obtener propiedades promedio comparables a los valores que se determinan en los experimentos) y adecuado para describir la formación y ruptura de enlaces covalentes. El Hamiltoniano resultante, utilizando un “esquema aditivo”,^[7] sería el dado por la Ecuación 1:

$$\hat{H}_{\text{eff}} = \hat{H}_{\text{MM}} + \hat{H}_{\text{QM}} + \hat{H}_{\text{QM/MM}} + \hat{H}_{\text{Bound}} \quad [1]$$

En la Ecuación 1, \hat{H}_{MM} , \hat{H}_{QM} , $\hat{H}_{\text{QM/MM}}$ son el Hamiltoniano clásico (con el que se trata la mayor parte del sistema enzimático y las moléculas de agua del disolvente), el Hamiltoniano cuántico (que describe todos

aquellos fragmentos del centro activo directamente implicados en la formación y ruptura de enlaces químicos) y el Hamiltoniano de interacción entre ambos subespacios del sistema completo. El término \hat{H}_{bound} es el Hamiltoniano utilizado para tratar las condiciones específicas del sistema, necesariamente finito.^[7] Utilizando estas herramientas, diferentes grupos, incluido el grupo de Bioquímica Computacional de la Universitat Jaume I de Castellón (UJI), han trabajado durante los últimos años ofreciendo imágenes detalladas de muchos fenómenos relacionados con la catálisis enzimática.

Las simulaciones teóricas sobre reactividad química se centran, en general, en la determinación de la energía libre de activación (ΔG^\ddagger), es decir, la diferencia de energía libre entre el estado de reactivos (RS) y su TS correspondiente. Esta magnitud se puede usar para predecir las constantes de velocidad determinadas experimentalmente a través de la Teoría del Estado de Transición (TST), una teoría desarrollada originalmente en el contexto de las reacciones en fase gaseosa.^[13] En el caso de reacciones en medios condensados, como las reacciones catalizadas por enzimas, el problema es más complejo. En primer lugar, el ciclo catalítico de una enzima implica varios pasos, como la unión del reactivo al centro activo, las etapas químicas y la liberación de los productos. Además, tal como se muestra en la Figura 2, los cambios conformacionales pueden tener lugar a lo largo de estos pasos definiendo micro-estados adicionales que deben ser considerados en un esquema cinético del ciclo catalítico.^[14] Este esquema cinético puede relacionarse con un paisaje de energía libre trazado en función de la coordenada química (ξ_1) y la coordenada del entorno (ξ_2). Cada uno de los posibles estados que aparecen a lo largo del proceso está representado por una cuenca donde sus profundidades relativas están relacionadas con la población de cada estado en equilibrio. En definitiva, el modelado computacional de una reacción química en medios condensados debe proporcionar las diferencias de energía libre entre el RS y el TS.

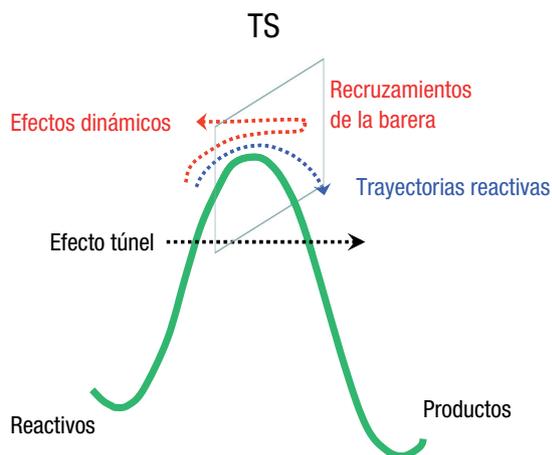


Figura 2. Representación esquemática de la contribución del efecto túnel y de las trayectorias no reactivas o *recrossing* a la transformación desde reactivos a productos en una reacción química

El TS se define como el máximo en el perfil de energía libre desde los reactivos hasta los productos a lo largo de la coordenada química (ξ_1). Para procesos uni-moleculares, la TST^[15] proporciona el marco teórico adecuado para predecir la constante de velocidad:

$$k(T, \xi) = \frac{k_B T}{h} e^{-\left(\frac{\Delta G^\ddagger(T, \xi)}{RT}\right)} \quad [2]$$

En la Ecuación 2, k_B es la constante de Boltzmann, R la constante universal de los gases ideales, h la constante de Planck y T la temperatura. La TST convencional se basa en varias aproximaciones, incluida la separabilidad de la coordenada química, el tratamiento clásico del movimiento a lo largo de esta coordenada y una distribución de equilibrio de Boltzmann entre los estados RS y TS. La Ecuación 2 se puede corregir para tener en cuenta algunas de estas limitaciones mediante la inclusión de un factor pre-exponencial. De esta manera, las constantes de velocidad se pueden evaluar utilizando la Teoría del Estado de Transición Variacional (VTST)^[16,17] que corrige la Ecuación 2 de posibles contribuciones del efecto túnel y efectos dinámicos:

$$k(T) = \Gamma(T, \xi) \frac{k_B T}{h} e^{-\left(\frac{\Delta G^\ddagger(T, \xi)}{RT}\right)} \quad [3]$$

En la Ecuación 3, $\Gamma(T, \xi)$ es el coeficiente de transmisión dependiente de la temperatura y de la coordenada distinguida, ξ . Éste se puede expresar como:

$$\Gamma(T, \xi) = \gamma(T, \xi) \cdot \kappa(T) \quad [4]$$

donde $\gamma(T, \xi)$ es el coeficiente de transmisión de recruzamiento que corrige la constante de velocidad debido a las trayectorias que, habiendo cruzado la superficie divisoria del TS desde el valle de reactivos a productos, regresan al valle de reactivos antes de alcanzar los productos. En la Ecuación 4, $\kappa(T)$ es el coeficiente del efecto túnel que introduce la contribución de aquellas trayectorias reactivas que no alcanzan el umbral clásico de energía (ver Figura 2). De acuerdo con la Ecuación 3, las diferentes contribuciones a la constante de velocidad pueden cuantificarse realizando simulaciones teóricas. Por último, el valor de la energía libre de activación de la Ecuación 3, ΔG^\ddagger , debe incluir correcciones de las energías vibracionales clásicas y cuánticas. Éstas pueden ser importantes en algunas reacciones, y claramente necesarias para obtener estimaciones precisas de KIEs.^[7,12]

En definitiva, los modelos para estudiar la actividad enzimática deberían centrarse en la elucidación del mecanismo de reacción (para encontrar la coordenada química apropiada), el cálculo del perfil de energía libre (que requiere el muestreo de las conformaciones relevantes del sistema como se muestra en la Figura 1) y la inclusión de otros factores, como el coeficiente de transmisión de recruzamiento (para tener en cuenta el acoplamiento dinámico entre la coordenada química y las coordenadas del entorno) y las correcciones cuánticas del efectos de túnel. Estas últimas pueden ser importantes en reacciones que implican la transferencia de una partícula ligera (proton,

hidruro o átomo de hidrógeno). Tal como se ha indicado, aunque varias teorías han tratado de explicar cómo funciona la catálisis biológica,^[3-9,18] existe un consenso creciente de que la enorme aceleración de las reacciones químicas logradas por las enzimas se debe en gran medida a la estabilización electrostática preferencial del TS traducida en una reducción de la barrera de energía libre.^[3,4] Los métodos computacionales pueden proporcionar valores sólidos de esta magnitud clave para comparar la teoría con los experimentos, proporcionando una imagen realista del proceso a nivel atómico.

Los mecanismos de reacción pueden determinarse mediante una exploración adecuada de las Superficies de Energía Potencial (PES, de sus siglas en inglés *Potential Energy Surface*) y la localización y caracterización de estructuras de puntos estacionarios (estructuras con gradiente igual a cero: RS, posibles intermedios, TS y productos). La superficie de energía libre (FES, de sus siglas en inglés *Free Energy Surface*), y por ende la energía libre de activación, se puede obtener mediante simulaciones realizadas a lo largo de una coordenada de reacción seleccionada utilizando algunas de las técnicas de muestreo proporcionadas por la Mecánica Estadística.

Nuestro grupo de investigación en la UJI, en numerosas ocasiones en colaboración con otros colegas tanto teóricos como experimentales, ha centrado su interés en los últimos años en el estudio de los mecanismos de acción de los biocatalizadores naturales. Las conclusiones derivadas de dichos estudios se han utilizado para llevar a cabo aplicaciones en el diseño de inhibidores enzimáticos y de biocatalizadores. En los siguientes tres epígrafes se describe brevemente un ejemplo de cada una de estas tres líneas de investigación. Por último, el artículo se cierra con un breve epígrafe de conclusiones y perspectivas de futuro.

CATÁLISIS ENZIMÁTICA

Tal como se ha indicado, los métodos QM/MM son una herramienta muy potente para, en combinación con técnicas experimentales, tratar de desvelar el origen de la catálisis enzimática. Obviamente, estos estudios se complican notablemente cuando la etapa química del proceso catalítico completo no se limita a una sola reacción química. Un ejemplo paradigmático lo encontramos en la reacción catalizada por la proteína timidilato sintasa (TSase). Tal como se presenta en la Figura 3, la TSase cataliza la metilación reductora de 2'-desoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP) usando 5,10-metilen-5,6,7,8-tetrahidrofolato (CH_2H_4 -folato) como donador de metileno y reductor de hidruro para formar 2'-desoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP) y 7,8-dihidrofolato (H_2 -folato). Esta enzima, junto con la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la serina hidroximetil transferasa (SHMT), forma parte de un ciclo que repone el CH_2H_4 -folato. La TSase es crucial para la biosíntesis de ADN, dado que el dTMP es uno de sus componentes básicos.

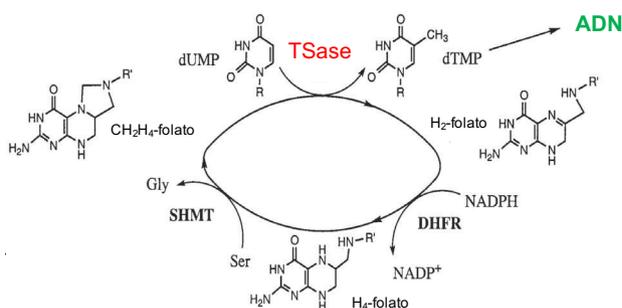


Figura 3. Representación esquemática del ciclo de regeneración del CH_2H_4 -folato. R = 2'-desoxiribosa-5'-fosfato; R' = (p-aminobenzoil) glutamato

Teniendo en cuenta que las células tumorales exhiben una replicación incontrolada, la inhibición de la TSase es, de hecho, un objetivo en el diseño racional de medicamentos contra el cáncer. Sin embargo, para inhibir la TSase en estas células, donde se detecta un aumento en sus niveles de expresión, se necesita una alta concentración del medicamento. Desafortunadamente, este exceso también daña los tejidos sanos, lo que resulta en toxicidad. Esto hace que sea difícil realizar tratamientos efectivos sin efectos secundarios y evitar el desarrollo de resistencia a los medicamentos. Todos estos hechos evidencian la importancia de conocer el mecanismo molecular de la TSase en detalle para el desarrollo de nuevos inhibidores que puedan actuar específicamente contra las células tumorales.

El estudio computacional de la TSase lo iniciamos hace más de una década en nuestro laboratorio, en colaboración con el grupo del profesor A. Kohen de la Universidad de Iowa.^[19] La exploración del mecanismo completo de la reacción a través de la obtención de las correspondientes PESs mediante métodos QM/MM reveló que se trataba de una reacción en cascada de 9 etapas. El mecanismo propuesto resultó ser más complejo que el inicialmente sugerido por Santi y Carreras,^[20] pero coincidía en reproducir la etapa de transferencia del hidruro (etapa 8 en la Figura 4) como la limitante del proceso cinético.^[19]

Estudios posteriores basados en la exploración de la FES de la etapa limitante de la velocidad a nivel AM1/MM confirmaron la sincronización de la transferencia de hidruro con la ruptura del enlace entre el C6 del sustrato y la Cys del centro activo de la proteína.^[21] Asimismo, la exploración computacional del proceso a diferentes temperaturas reveló la independencia con la temperatura de la energía de activación y de los efectos dinámicos en el intervalo de temperaturas explorado experimentalmente.^[21,22,23] En concreto, se observó la invariancia de la distancia entre donador y aceptor (DAD) del hidruro en el TS obtenido a las diferentes temperaturas, así como la conservación del coeficiente de transmisión de recruzamiento. Estos resultados definían un centro activo perfectamente optimizado para dicha transferencia.

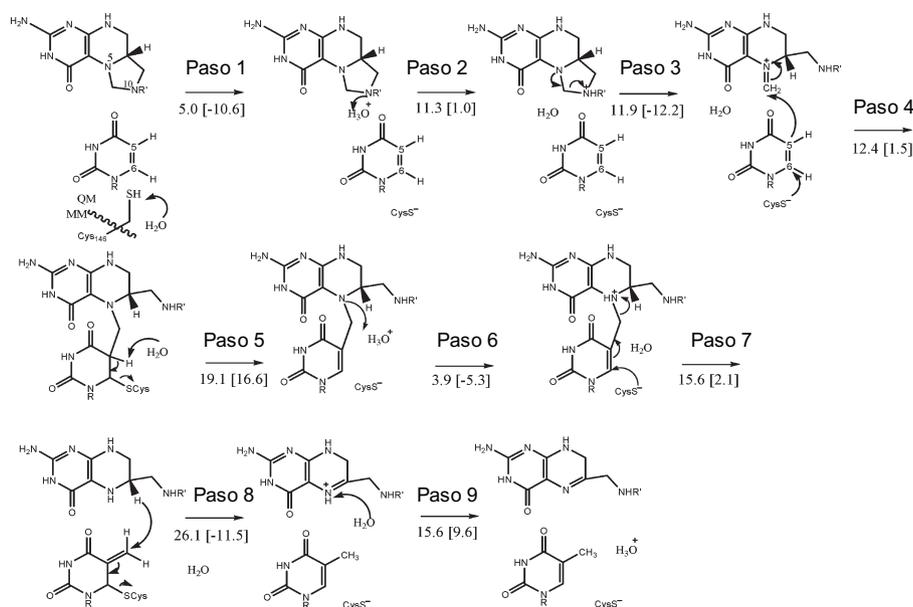


Figura 4. Mecanismo de reacción para la reacción catalizada por la *E. coli* TSase, obtenido a partir de PESs calculadas a nivel AM1/MM.^[19] Los valores numéricos debajo de las flechas representan las barreras de energía potencial mientras que los valores en corchetes son las energías de reacción de cada paso

© 2020 Real Sociedad Española de Química

Un estudio posterior basado en la VTST, se centró en el cálculo y análisis de la contribución del efecto túnel a diferentes temperaturas, así como la estimación del KIE primario resultante de sustituir el hidrógeno que se transfiere por tritio.^[24] Los KIEs fueron calculados como el cociente de las constantes de velocidad para la transferencia del hidrógeno y del tritio mediante la Ecuación 3, incluyendo las correcciones vibracionales clásicas y cuánticas, el efecto túnel y los efectos de recruzamiento. Los KIEs obtenidos mostraron un comportamiento independiente de la temperatura, de acuerdo con resultados experimentales previos del profesor Kohen.^[25] Los coeficientes de recruzamiento resultaron ser casi invariables con la temperatura y, en todos los casos, lejos de la unidad. Este resultado mostraba un acoplamiento significativo entre movimientos de la proteína (ξ_j) y las coordenadas de reacción distinguidas seleccionadas (ξ_i). En particular, el movimiento relativo de una arginina del centro activo (Arg166 en *E. coli*) parecía estar acoplado con la cisteína unida al sustrato (Cys146 en *E. coli*) polarizando el enlace tioéter y facilitando la ruptura del enlace que tiene lugar de forma acoplada a la transferencia del hidruro. Estos movimientos de la enzima representan en realidad algunas de las dimensiones de la coordenada de reacción real. La estructura de la proteína es tal que facilita la población eficientemente de aquellas conformaciones que disminuyen tanto la altura como el ancho de la barrera, mejorando así la probabilidad de transferencia de hidruro con contribución del efecto túnel (a través de barrera) o mediante el mecanismo clásico (por encima de la barrera). En otras palabras, las fluctuaciones térmicas que se acoplan a la coordenada de reacción, así como las

geometrías del TS y el efecto túnel, son las mismas en las diferentes temperaturas, dentro del intervalo examinado. Todos estos términos contribuyen a obtener unos KIEs independientes de la temperatura, tal como se observa experimentalmente. Resulta importante destacar como la contribución de los efectos dinámicos a la catálisis, estimados a partir del valor de la energía de activación efectiva derivada del valor del coeficiente de recruzamiento, resultó ser en todos los casos inferior a una kcal·mol⁻¹. Estos resultados obtenidos a nivel AM1/MM fueron posteriormente confirmados mediante cálculos QM/MM describiendo la región QM con otros métodos semiempíricos y con niveles de cálculo más elevados como los basados en la teoría de funcional de la densidad (DFT).^[26] Igualmente interesante fue determinar la importancia de la exploración conformacional en los resultados teóricos, y su impacto en las energías de activación.^[27] Los resultados dejaron patente la necesidad de considerar estructuras de la proteína diferentes a la estructura inicial de rayos X. Los cristales de las proteínas que se utilizan en la difracción de Rayos X se obtienen en condiciones diferentes a las condiciones fisiológicas y, por tanto, no se corresponden necesariamente con conformaciones reactivas.

DISEÑO DE INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

Tal como se ha indicado, la enzima TSase es una de las dianas más importante para el diseño de fármacos con propiedades anticancerígenas. El conocimiento detallado del mecanismo de reacción de una enzima, en este caso la TSase, nos coloca en una posición privilegiada para el diseño de

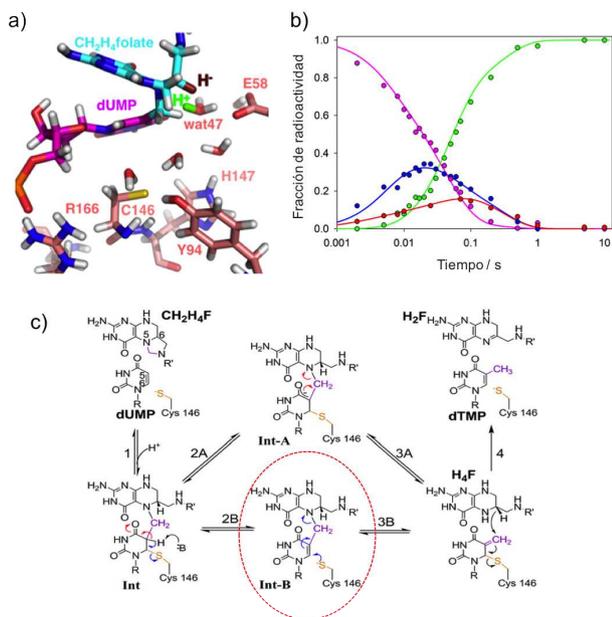


Figura 5. a) Detalle del bisustrato intermedio localizado en el centro activo de la EcTSase, obtenido a partir de cálculos DFT/MM.^[28] b) Medidas de la cinética de la reacción catalizada por la EcTSase: evolución del consumo de [2-14C]dUMP (rosa), formación de dTMP (verde), y generación del Int-B (azul).^[30] c) Mecanismo tradicional (A) y alternativo (B) obtenidos a partir de cálculos DFT/MM.^[30] Int-B = bisustrato intermedio; R = 2'-deoxirribosa-5'-fosfato; R' = (p-aminobenzoil) glutamato

moléculas estables que la puedan bloquear y, consecuentemente, ralentizar o incluso parar el crecimiento de tumores. En 2013, nuestros esfuerzos en este complejo sistema se centraron en la etapa de transferencia protónica (etapa 7 en la Figura 4).^[28] Nuestros cálculos de la FES mostraron que la transferencia del protón tenía tres posibles TSs energéticamente similares, pero estructuralmente diferentes. Estas conclusiones diferían de nuestros resultados anteriores para la transferencia de hidruro, y proporcionaban una explicación a las diferencias en la dependencia con temperatura de los KIE intrínsecos en estos dos pasos de activación de enlaces C-H. Tal vez más significativo fue que los cálculos también sugerían que el enlace covalente propuesto tradicionalmente entre la proteína (Cys146) y el C6 del sustrato es muy lábil durante la reacción catalítica completa. Los movimientos proteicos colectivos no solo ayudan a la escisión del enlace C6-S para estabilizar el TS del paso de transferencia del protón, sino que también reorganizan la red de enlaces de hidrógeno al final de este paso para preparar el sitio activo para los pasos químicos posteriores. Los cambios conformacionales sincronizados de la proteína y los ligandos observados en nuestras simulaciones confirmaban la participación de algunos movimientos de aquélla en la coordinada de reacción. Nuestras FESs, obtenidas mediante cálculos QM/MM con la región QM descrita a nivel DFT, sugerían un mecanismo diferente al tradicionalmente aceptado en el que, a través de una serie de intermedios unidos covalentemente, el enlace con la proteína solo se escindiría tras la liberación del producto. La existencia de un nuevo intermedio de reacción no

unido covalentemente a la proteína (Figura 5a)^[28] podía tener un gran impacto ya que puede conducir a una nueva clase de fármacos dirigidos a la inhibición de la biosíntesis de ADN.

Tres años más tarde, en 2016, el grupo del profesor Kohen publicó evidencias experimentales de la existencia de dicho bisustrato intermedio no enlazado covalentemente a la proteína.^[29] La síntesis del intermedio propuesto y los hallazgos que respaldan su competencia química y cinética corroboraban la posibilidad de un mecanismo no tradicional y el potencial de este intermedio como un nuevo fármaco. Cálculos QM/MM más recientes en combinación con medidas cinéticas, se han centrado en confirmar y desvelar el origen de dicho intermedio en el proceso catalítico de la TSase (Figura 5b).^[30] En concreto, se aisló y caracterizó el intermedio bisustrato no covalente previamente propuesto formado en la reacción catalizada por la timidilato sintasa. Nuestros resultados sugerían que las especies de bisustrato se producen en gran medida debido a una vía paralela (Figura 5c). Nuestros hallazgos no solo corroboraban la relevancia del intermedio no covalente propuesto anteriormente, sino que también respaldaban las posibles implicaciones del intermedio covalente sobreestabilizado.

DISEÑO BIOCATALIZADORES

El diseño de nuevas enzimas para resolver desafíos prácticos en todas las ramas de la ciencia y la tecnología se ha beneficiado de la introducción de la tecnología recombinante del ADN en las últimas décadas.^[31] El potencial del uso de enzimas en transformaciones químicas en la academia y la industria está respaldado por las ya muchas estructuras de diseño con probadas aplicaciones. La relevancia de este campo ha sido reconocida recientemente por la Real Academia de Ciencias sueca cuando se le otorgó el premio Nobel de Química 2018 a F. H. Arnold por llevar a cabo la primera evolución dirigida de enzimas.^[32] El método imita el proceso de evolución natural, haciendo mutaciones aleatorias o recombinaciones para desarrollar proteínas en el laboratorio identificando las variantes exitosas por cribado o por selección. La ventaja de esta estrategia es que no se necesita información estructural y se pueden explorar regiones del espacio secuencial distantes del sitio activo. Sin embargo, la evolución dirigida está limitada por el hecho de que incluso los métodos de selección de alto rendimiento solo muestrean una fracción de las secuencias que pueden generarse por la mayoría de los métodos de diversificación. El desarrollo de protocolos eficientes para localizar aminoácidos de la proteína cuya mutación conduzca a una mayor actividad enzimática no es trivial, y esta estrategia requiere un umbral mínimo de actividad para comenzar con éxito el proceso de mutagénesis dirigida.

Un enfoque alternativo es el conocido como “diseño racional”, que se refiere a la introducción de mutaciones de residuos seleccionados en posiciones específicas de una

proteína ya existente, o el diseño de proteínas *de novo*, donde la enzima completa se construye desde cero. En cualquier caso, el diseño es dirigido por el análisis de datos obtenidos de diferentes fuentes, que van desde la difracción de rayos X hasta simulaciones computacionales.^[33] Ambos tipos de estrategias requieren el conocimiento del TS de la reacción a catalizar y, en consecuencia, los métodos QM/MM pueden ser una herramienta fundamental para asistir en el diseño.

La reacción elegida como ejemplo en esta sección es la reacción de eliminación de Kemp, que consiste en la conversión de benzoisoxazoles en salicilonitrilos, una reacción bien estudiada que tiene lugar mediante un mecanismo de eliminación concertada (ver Figura 6). La reacción implica una transferencia de un protón desde un átomo de carbono del sustrato a una base (Asp127 en la Figura 6), concomitante con la apertura del anillo, creando así una especie aniónica.^[34] El hecho de que no se haya identificado ninguna Kemp eliminasa (KE) natural, junto con el hecho de que no es una reacción muy compleja, explica que se haya utilizado como punto de referencia de diferentes protocolos para diseñar nuevas enzimas. Tal como se muestra en la Figura 6, la reacción puede describirse como una transferencia electrónica desde la base (Asp127) hasta el oxígeno saliente del sustrato, O1.

A partir de una KE diseñada por Hilvert, Houk, Mayo y colaboradores con la ayuda de simulaciones computacionales (HG-3),^[35] Hilvert y colaboradores desarrollaron una nueva KE artificial (HG3.17) con una actividad catalítica cercana a la eficiencia excepcional de las enzimas naturales.^[36] Nuestro grupo de investigación, en colaboración con el profesor J. Bertran de la Universitat Autònoma de Barcelona y el profesor I. Tuñón de la Universitat de València, elegimos este sistema para tratar de entender el origen de este inusual éxito en el diseño de nuevas enzimas.^[37] El estudio empezó por el análisis de las posibles conformaciones de reactivos a través de dinámicas moleculares QM/MM. El resultado fue la presencia de dos tipos de conformaciones diferentes en los dos monómeros que componen el dímero de la HG3.17.^[35] Estas dos conformaciones diferentes fueron el punto de partida para la generación de las FESs a nivel AM1/MM, corregidas

posteriormente a nivel DFT/MM. Sorprendentemente, las dos FESs proporcionaron energías libres de activación significativamente diferente, 16.3 y 13.8 kcal·mol⁻¹. Este último valor resultó estar cerca del valor que se puede deducir de la constante cinética experimental aplicando la TST: 13.7 kcal·mol⁻¹. La mayor reactividad obtenida en esta segunda conformación estaba relacionada con una mejor preorganización electrostática del entorno, el cual crea un potencial electrostático más favorable para que la reacción tenga lugar (ver Tabla 1).

Tabla 1. Predicciones a partir de cálculos QM/MM del potencial electrostático medio generado por dos KEs sobre el oxígeno saliente O1 (en kJ·mol⁻¹·e⁻¹) y la energía libre de activación (en kcal·mol⁻¹). "HG3.17 - A" y "HG3.17 - B" representan dos conformaciones significativamente diferentes obtenidas a partir de simulaciones de QM/MM MD

	HG3.17 - A	HG3.17 - B	HG-3
V _R	141 ± 26 ^[a]	204 ± 33 ^[a]	125 ± 19 ^[b]
V _{TS}	213 ± 31 ^[a]	298 ± 29 ^[a]	150 ± 18 ^[b]
ΔG [‡] (tco)	16.3 ^[a]	13.8 ^[a]	17.5 ^[b]
ΔG [‡] (exp)	13.7 ^[c]		17.7 ^[d]

^[a] Referencia 37. ^[b] Referencia 38. ^[c] Referencia 36. ^[d] Referencia 35.

Tal como se observa en la Tabla 1, el potencial electrostático generado por la proteína en el átomo de oxígeno saliente en reactivos (O1) era más positivo en el monómero más reactivo que en el de menor reactividad positivo. Esta tendencia se reprodujo en el TS. Cuando repetimos este estudio computacional con la KE menos evolucionada mencionada anteriormente, la HG-3 cuyo ensamblaje biológicamente activo es un monómero,³⁵ se repitieron las tendencias. En primer lugar, la energía libre de activación obtenida resultó ser 17.5 kcal·mol⁻¹, superior a la del HG3.17 y muy próxima al valor deducido de la constante de velocidad medida experimentalmente, 17.7 kcal·mol⁻¹. Además, y tal vez más importante, se confirmó la correlación entre reactividad y propiedades electrostáticas, tal como se observa en la Tabla 1. El valor del potencial electrostático generado por la proteína en el oxígeno saliente fue mucho menor que en el caso de la HG3.17, tanto en reactivos como en el TS. En este caso, se observó un menor cambio en el potencial electrostático entre reactivos y TS, sin duda indicativo de una menor flexibilidad de la proteína.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

Los ejemplos seleccionados en este artículo muestran las posibilidades que tiene la Química Computacional para desvelar el origen de la capacidad catalítica de las enzimas. Nuestros resultados indican como la pre-organización de

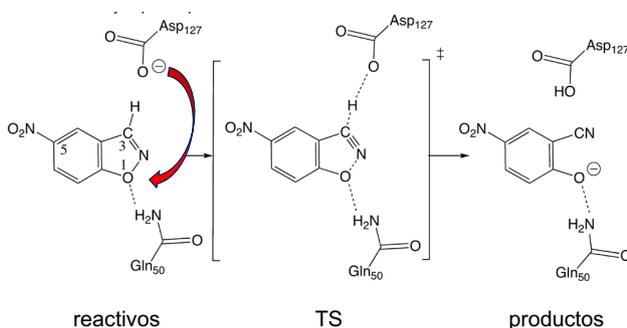


Figura 6. Reacción de eliminación de Kemp. La flecha roja representa la transferencia formal de carga negativa desde la base (Asp127 según la estructura de la enzima HG3.17)^[36] hasta el grupo saliente (O1 del sustrato)

la distribución de cargas de los diferentes aminoácidos que forman las enzimas generan unas condiciones que favorecen la estabilización del TS de la reacción que catalizan. Los efectos dinámicos, entendidos como aquellos movimientos de la proteína que puedan estar acoplados a la coordenada de reacción distinguida, tienen una contribución menor en la disminución de la barrera de la reacción. La coordenada de reacción real incluye no solo coordenadas del sistema químico sino también grados de libertad asociados a la proteína. Hemos mostrado como el conocimiento detallado del mecanismo de reacción de una enzima (la TSase) puede ser utilizado para el diseño de nuevos inhibidores enzimáticos. La química computacional es crucial para el desarrollo de protocolos basados en el conocimiento del mecanismo de reacción, incluyendo los posibles TSs e intermedios que aparecen a lo largo del camino de reacción, en ocasiones no evidentes a partir de datos experimentales. Las predicciones teóricas basadas en resultados de la Química Computacional pueden preceder en muchos casos las evidencias experimentales. Por último, la importancia de la estabilización electrostática del TS se ha demostrado en dos diseños *de novo* de enzimas capaces de catalizar la reacción de eliminación de Kemp con distinta efectividad. En este caso, los esfuerzos para mejorar sus propiedades catalíticas deberían estar enfocados en posibles mutaciones que aumentarían la preorganización, favoreciendo la estabilización electrostática alrededor del oxígeno saliente del sustrato. Las mutaciones para diseñar nuevas enzimas deben considerarse no solo en la primera capa de residuos, sino también en otras regiones alejadas del sitio activo, ya que las propiedades electrostáticas de las proteínas incluyen interacciones de largo alcance. El presente trabajo enfatiza el hecho de que no todas las características de la catálisis pueden revelarse a partir de una sola estructura derivada de difracción de rayos X.

En el futuro, nuevos desarrollos metodológicos unidos a avances en la potencia de nuestros ordenadores van a tener lugar, confirmando la necesidad de una mayor interacción entre simulaciones teóricas y experimentos para comprender mejor los procesos bioquímicos. Nuevas aplicaciones basadas en el conocimiento de los procesos químicos que tienen lugar en la naturaleza se desarrollarán a partir de esta combinación de técnicas para afrontar retos que permitan mejorar la vida en la Tierra. Éstos incluyen el tratamiento de enfermedades, el desarrollo de energías renovables o problemas relacionados con el medio ambiente como puede ser la gestión de residuos o el problema del calentamiento global del planeta, en general.

AGRADECIMIENTOS

Este artículo, como todo en ciencia, ha sido el resultado del trabajo de muchas/os investigadoras/es presentes y pasados del grupo de investigación, así como de colaboradores de otros grupos que han contribuido al desarrollo de los diferentes proyectos. A todas/os les quedo muy agra-

decido. Quiero destacar mi agradecimiento a A. Kohen, K. Świderek, J. Bertran, I. Tuñón, S. Martí, N. Kanaan, S. Ferrer, Z. Wang y S. A. Kholodar, por su colaboración en los trabajos que se han destacado en el presente artículo y todo lo que he aprendido con ellos/as. Los trabajos de investigación han sido financiados en diversas convocatorias del Ministerio de Economía y Competitividad, el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, la Generalitat Valenciana, la Universitat Jaume I y el National Institute of Health de EE. UU. Finalmente, quiero agradecer a la Real Sociedad Española de Química por el “Premio a la Excelencia Investigadora RSEQ 2018”.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] “Biocatalysis in Industry” *Chem. Rev.* **2018**, 118.
- [2] M. Drag, G. S. Salvesen, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 690-701.
- [3] A. Warshel, P. K. Sharma, M. Kato, Y. Xiang, H. Liu, M. H. M. Ols-son, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3210-3235.
- [4] S. Martí, M. Roca, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, J. Bertran, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 98-107.
- [5] S. J. Benkovic, S. Hammes-Schiffer, *Science* **2003**, *301*, 1196-1202.
- [6] M. García-Viloca, J. Gao, M. Karplus, D. G. Truhlar, *Science* **2004**, *303*, 186-195.
- [7] “Simulating Enzyme Reactivity. Computational Methods in Enzyme Catalysis”; I. Tuñón, V. Moliner, Eds.; RSC, Cambridge, 2016.
- [8] J. A. Gerlt, *Biochemistry* **2018**, *57*, 3085-3086.
- [9] L. Pauling, *Chem. & Eng. News Arch.* **1946**, *24*, 1375-1377.
- [10] Q. Xue, E.S. Yeung, *Nature* **1995**, *373*, 681-683.
- [11] A. J. Turner, V. Moliner, I. H. Williams, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 1323-1331.
- [12] S. Ferrer, I. Tuñón, S. Martí, V. Moliner, M. García-Viloca, A. González-Lafont, J. M. Lluch, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 16851-16863.
- [13] D. G. Truhlar, *Arch Biochem Biophys*, **2015**, *582*, 10-17.
- [14] J. Villali, D. Kern, *Curr Opin Chem Biol*, **2010**, *14*, 636-643.
- [15] D.G. Truhlar, W.L. Hase, J.T. Hynes, *J. Phys. Chem.*, **1983**, *87*, 2664-2682.
- [16] S. Glasstone, H. Eyring, K.J. Laidler, *The theory of rate processes: the kinetics of chemical reactions, viscosity, diffusion and electrochemical phenomena.* (1941), Nueva York, Londres, McGraw-Hill.
- [17] D. G. Truhlar, B. C. Garrett, S. J. Klippenstein, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 12771-12800.
- [18] D. Ringe, G. A. Petsko, *Biochemistry* **2008**, *320*, 1428-1429.
- [19] N. Kanaan, S. Martí, V. Moliner, A. Kohen, *Biochemistry* **2007**, *46*, 3704-3713.
- [20] W. C. Carreras, D. V. Santi, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 721-762.
- [21] N. Kanaan, S. Martí, V. Moliner, A. Kohen, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 2176-2182.
- [22] N. Kanaan, M. Roca, S. Martí, V. Moliner, I. Tuñón, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 13593-13600.
- [23] N. Kanaan, M. Roca, S. Martí, V. Moliner, I. Tuñón, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 11657-11664.
- [24] N. Kanaan, S. Ferrer, S. Martí, M. García-Viloca, A. Kohen, V. Moliner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6692-6702.
- [25] N. Agrawal, B.Y. Hong, C. Mihai, A. Kohen, *Biochemistry* **2004**, *43*, 1998-2006.
- [26] K. Świderek, K. Arafet, A. Kohen, V. Moliner, *J. Chem. Theor. Comput.* **2017**, *13*, 1375-1388.

- [27] K. Świderek, A. Kohen, V. Moliner. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 30793-30804.
- [28] Z. Wang, S. Ferrer, V. Moliner, A. Kohen *Biochemistry* **2013**, *52*, 2348-2358.
- [29] S. A. Kholodar, A. Kohen *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 8056-8059.
- [30] S. A. Kholodar, A. K. Ghosh, K Świderek, V Moliner, A. Kohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2018**, *115*, 10311-10314.
- [31] C. Zeymer, D. Hilvert, *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 131-157.
- [32] F. H. Arnold, *Nature* **2001**, *409*, 253-257.
- [33] K. Świderek, I. Tuñón, V. Moliner, *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2014**, *4*, 407-421.
- [34] M. L. Casey, D. S. Kemp, K. G. Paul, D. D. Cox, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2294-2301.
- [35] H. K. Privett, G. Kiss, T. M. Lee, R. Blomberg, R.A. Chica, L. M. Thomas, D. Hilvert, K. N. Houk, S. L. Mayo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 3790-3795.
- [36] R. Blomberg, H. Kries, D. M. Pinkas, P. R. E. Mittl, M. G. Grütter, H.K. Privett, S. L. Mayo, D. Hilvert, *Nature* **2013**, *503*, 418-421.
- [37] K. Świderek, I. Tuñón, V. Moliner, J. Bertran *ACS Catal.* **2015**, *5*, 2587-2595.
- [38] K. Świderek, I. Tuñón, V. Moliner, J. Bertran *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 7582-7589.

¿Quieres ser socio de una de las sociedades científicas más importantes de España?



RSEQ
Real Sociedad Española de Química
www.rseq.org