

Lipoxigenasa y glutamato racemasa: dos dianas terapéuticas

••• ¿Cómo pueden las enzimas incrementar la velocidad de una reacción entre 10⁷ y 10¹² veces, llegando incluso en algunos casos a factores de 10¹⁹? Esta es una cuestión que todavía plantea infinidad de retos a la comunidad científica del siglo XXI. A pesar de los enormes avances de la Ciencia, y aunque muchos elementos del puzzle han sido elucidados por estudios bioquímicos y estructurales, todavía estamos muy lejos de tener un conocimiento completo de los mecanismos de reconocimiento enzima-substrato y de los mecanismos de reacción que hacen de las enzimas los catalizadores más eficientes de la Naturaleza, superando en mucho cualquier creación humana en el campo de la catálisis. El auténtico origen del poder catalítico de las enzimas es pues aún un tema de controversia.

Prof. **Àngels Gonzalez Lafont**,
Departamento de Química,
**Universitat Autònoma de
Barcelona** y miembro de la **Red
de Referencia en Química
Teórica y Computacional**

NO OBSTANTE, las enzimas obedecen de hecho a las mismas leyes básicas de la naturaleza que gobiernan el comportamiento de todas las demás especies químicas. Según R.P. Feynman (1963): *"Certainly no subject or field is making more progress on so many fronts at the present moment than biology, and if we were to name the most powerful assumption of all, which leads one on and on in an attempt to understand life, it is that all things are made of atoms, and that everything that living things do can be understood in terms of the jiggings and wiggings of atoms."* Sin embargo, el enorme número de átomos que forman parte de una enzima introduce múltiples fenómenos cooperativos que son, al mismo tiempo, responsables de su eficiencia y de su inmensa complejidad. De aquí que durante casi 200 años la única aproximación viable

para el estudio de las reacciones enzimáticas ha sido prácticamente la experimental. Es ya muy a finales del siglo XX y, especialmente, en lo que va de siglo XXI que la aproximación teórica a la catálisis enzimática empieza a ser también viable y fiable, complementaria de la aproximación experimental, y con una capacidad de análisis detallado de los procesos, tan-

to en la escala espacial como temporal, claramente superior a la experimental. Este fenómeno se ha producido, por un lado, gracias al desarrollo de los métodos QM/MM (Quantum Mechanical/Molecular Mechanical) que permiten calcular la superficie de energía potencial de sistemas de miles de átomos incluyendo las interacciones entre los átomos de la enzima,

de su ligando y de las aguas de solvatación. Por otro lado, se ha producido un gran desarrollo de los métodos dinámicos que han permitido simular los movimientos de esos miles de núcleos, tanto para estudiar los procesos de entrada al centro activo del substrato y salida del producto, como para recorrer suficientemente el espacio configuracional de los núcleos y calcular constantes de velocidad de las reacciones. Hay que tener en cuenta que las enzimas son entidades muy flexibles en general, con residuos que pueden experimentar importantes fluctuaciones térmicas. Pero todo este desarrollo teórico no hubiera sido posible sin la existencia de nuevos ordenadores y superordenadores que han aumentado de forma exponencial la capacidad de cálculo, memoria y disco en los últimos 10 años.

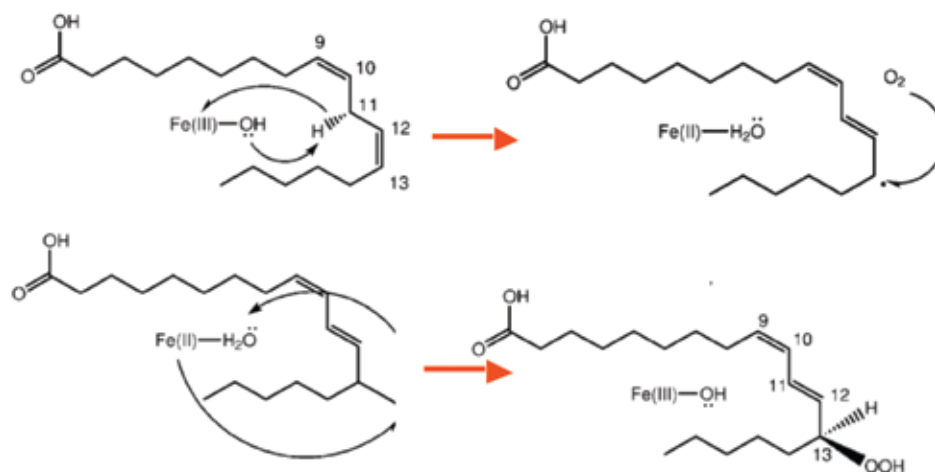
Nuestro grupo de investigación en el Departamento de Química de la UAB proviene del campo de la Química y tiene una extensa experiencia en el estudio teórico de la reactividad química. En lo que va del presente siglo XXI nuestro

••• Sobre el autor

Àngels Gonzalez-Lafont nació en Barcelona en 1961. Estudió en la Universitat Autònoma de Barcelona, donde recibió su Licenciatura en Química en 1984 y el Doctorado en Química en 1989. Realizó una estancia Post Doctoral con una beca Fulbright en la University of Minnesota (USA) bajo la supervisión del Prof. D. G. Truhlar. En diciembre de 1992 va consiguió una plaza permanente de Profesor Asociado en el Departamento de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona. Hasta el día de hoy ha publicado más de 100 artículos en revistas de alto nivel y ha supervisado 6 tesis doctorales en química teórica. Su investigación está centrada en el estudio teórico de los mecanismos involucrados tanto en procesos atmosféricos como en reacciones de catálisis enzimática. El estudio de estos mecanismos va desde los aspectos puramente electrónico-estructurales hasta la inclusión de la contribución dinámica dels nucleos. El cálculo teórico de las constantes de velocidad de estos procesos en función de la temperatura y/o la presión, se hace mediante el uso de la Teoría Variacional del Estado de Transición y la inclusión del efecto túnel.

grupo ha ido progresivamente dedicándose cada vez más al estudio teórico de sistemas biológicos (fundamentalmente reacciones enzimáticas hasta el momento), aprovechando precisamente su experiencia en los métodos dinámicos de la reactividad química. La extensión de nuestro campo de estudio a los problemas biológicos ha motivado que parte de nuestro grupo de investigación sea también miembro del Instituto de Biotecnología y Biomedicina de la Universidad Autónoma de Barcelona desde el año 2002.

El objetivo final de estos estudios teóricos son, sin duda, las aplicaciones prácticas de estos conocimientos de gran importancia en farmacología, biotecnología y biomedicina y entre las que destacaré especialmente el diseño de inhibidores estructurales y el diseño de inhibidores de mecanismo. Los inhibidores estructurales son aquellos que, o bien se enlazan de forma reversible a la enzima (mediante enlaces no covalentes) y son así competitivos con el sustrato, o bien que forman enlaces covalentes con la enzima bloqueando su acción catalítica de forma irreversible y permanente. Los inhibidores de mecanismo o estados de transición análogos sólo se pueden diseñar tras un conocimiento detallado del mecanismo de reacción catalítica. Son moléculas análogas al sustrato con un grupo químico reactivo que se mantiene en estado latente hasta que en algún punto del mecanismo de reacción se convierte en un grupo funcionalmente reactivo. En este momento el inhibidor de mecanismo forma un enlace con la enzima que bloquea la reacción catalítica. La metodología existente en la actualidad, y la que podemos desarrollar en los próximos años, nos ha de permitir contribuir como químicos teóricos interesados en estudiar problemas biológicos



Esquema 1.

Entre los objetivos finales de estos estudios teóricos destaca especialmente el diseño de inhibidores estructurales y el diseño de inhibidores de mecanismo

desde el punto de vista molecular, a este campo del diseño de inhibidores donde aún hay mucho camino por andar. En este artículo presento muy someramente algún aspecto de nuestro trabajo sobre dos familias de enzimas (lipoxigenasas y glutamato racemasas) consideradas dianas terapéuticas y de las que se buscan inhibidores más eficientes y específicos.

Las lipoxigenasas son una familia de enzimas dioxigenasas

que contienen un grupo de hierro no-hémico y que participan en el proceso de peroxidación lipídica. En particular, estas enzimas son las responsables de catalizar la hidroxilación de ácidos grasos poliinsaturados ω -6, como el ácido linoleico y el ácido araquidónico, o la de sus correspondientes ésteres lipídicos. Las lipoxigenasas son enzimas que se encuentran muy extendidas en plantas y en mamíferos. En plantas (por ejemplo, la lipoxigenasa de las semillas de soja, SLO-1) están involucradas en procesos inmunológicos, de regulación del crecimiento y en la germinación. La actividad biológica de las lipoxigenasas de mamífero incluida la humana no es del todo conocida pero se ha relacionado la lipoxigenasa 5 humana con la enfermedad del asma y con el cáncer; la lipoxigenasa 12 humana con procesos de soriasis y con el cáncer, y la lipoxigenasa 15 humana (15-LOX) con problemas cardiovasculares como la aterosclerosis y también con el cáncer. La numeración de estas diferentes isoenzimas hace referencia a la posición de la cadena hidrocarbonada de lípido sobre la cual se lleva a cabo la hidroxilación. Existen evidencias de los efectos proateroscleróticos de la 15-LOX incluyendo una

contribución directa a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). No obstante, también existe otra línea de evidencias que demuestran que diferentes metabolitos de la 15-LOX procedentes del ácido araquidónico y del ácido linoleico actuarían como agentes antiinflamatorios. De aquí que, para desarrollar agentes terapéuticos efectivos contra estas enfermedades, sea muy importante el conocimiento detallado del centro activo de estas enzimas y de sus mecanismos de reacción, ya que es necesario que los inhibidores sean específicos de una isoenzima particular de lipoxigenasa. El mecanismo propuesto para la hidroxilación de ácidos grasos por las enzimas lipoxigenasas se muestra en el esquema 1 para el ácido linoleico.

En un trabajo previo en nuestro grupo de investigación realizamos un estudio dinámico de la reacción de sustracción de hidrógeno desde el C11 del ácido linoleico por parte del cofactor Fe(III)-OH- en la enzima SLO-1 ya que esta reacción constituye la etapa determinante del proceso global de hidroxilación del ácido linoleico. El modelo escogido consistió en un sistema constituido por la enzima completa

incluyendo las aguas de solvatación y el sustrato real (ácido linoleico) con un total de 17837 átomos. Realizamos una simulación molecular utilizando metodologías puramente dinámicas combinadas con métodos estadísticos de tratamiento del movimiento nuclear y calculando la superficie de energía potencial mediante técnicas QM/MM. La teoría Ensemble-Averaged Variational Transition-State Theory with Multidimensional Tunneling (EA-VTST/MT) nos ha permitido calcular la constante de velocidad y el correspondiente efecto cinético isotópico (KIE) primario de deuterio para la reacción de sustracción de hidrógeno del ácido linoleico en la SLO-1 a 303 K.

Nuestros resultados indican que la distancia entre el átomo dador del hidrógeno y el átomo aceptor del hidrógeno en el complejo de Michaelis de la SLO-1 es muy corta; el centro activo de la enzima nativa SLO-1 está muy comprimido y es muy rígido. Esta comprensión del centro activo en la SLO-1 nativa hace que la barrera de energía potencial correspondiente a la transferencia de hidrógeno sea muy estrecha, de tal manera que el efecto cuántico de túnel se hace enorme aumentando de forma muy significativa la velocidad de la reacción catalítica. Esta contribución enorme del efecto túnel en esta reacción se había propuesto anteriormente a partir de resultados experimentales ya que el efecto cinético isotópico de 81 a 303 K medido en la SLO-1 representa el valor de KIE más grande encontrado en un sistema biológico. Nuestro trabajo es una confirmación, a partir de un modelo molecular completo del sistema enzima-sustrato incluyendo el entorno acuoso, de que este fenómeno cuántico puede aumentar la velocidad de la catálisis enzimática de forma espectacular siendo por tanto un factor im-

**Actualmente
estamos trabajando
también en
la simulación
mediante técnicas
de Dinámica
Molecular de la
enzima glutamato
racemasa de
Helicobacter pylori
que es una bacteria
que infecta el
estómago humano**

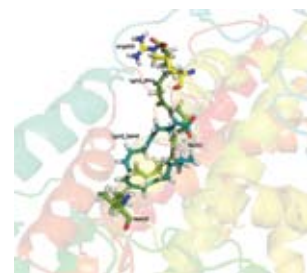
portantísimo a considerar si queremos entender en general la base física del poder catalítico de las enzimas, y en particular de las lipoxigenasas.

El trabajo realizado con la enzima SLO-1 constituye el primer paso de un proyecto más ambicioso en el que queremos analizar, a nivel mecanístico y dinámico, el proceso de hidroperoxidación de ácidos grasos catalizado por la enzima 15-Lipoxigenasa (15-LOX) de mamíferos. El ácido araquidónico (AA), principal sustrato de las lipoxigenasas de mamífero, es un ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono y cuatro dobles enlaces en cis que presenta una gran flexibilidad conformacional. De hecho, se ha estimado que esta molécula presenta más de 107 conformaciones de baja energía. Por ello la búsqueda de aquellas conformaciones de este sustrato denominadas bioactivas es muy complicada, aunque esta diversidad conformacional

puede ser un factor importante a considerar para poder explicar la reactividad del AA y que sea el precursor tanto de lipoxinas como de leucotrienos que son moléculas mediadoras en procesos inflamatorios y reguladoras del sistema inmune.

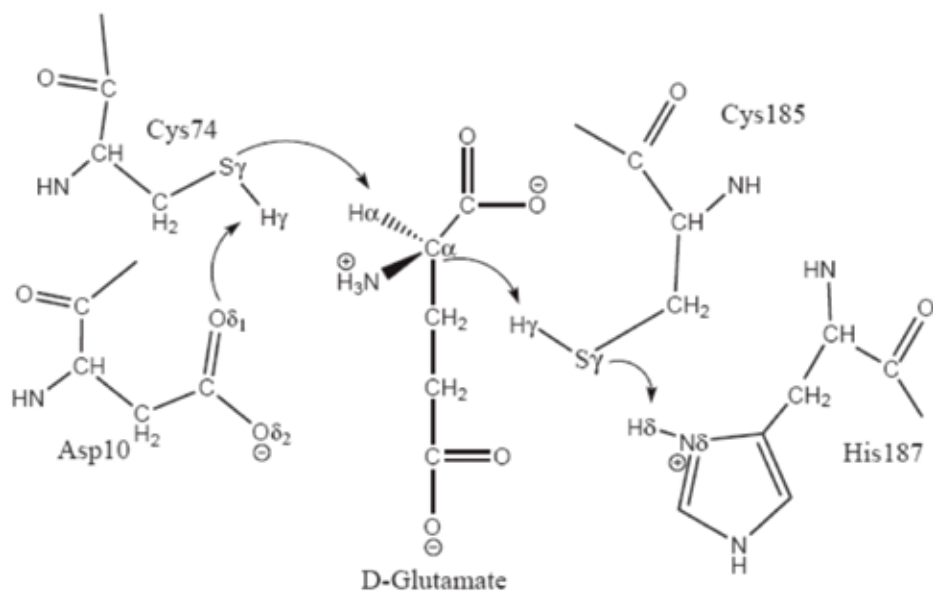
Recientemente (2007), la estructura cristalográfica de la 15-LOX de conejo ha sido revisada. Se trata de una estructura dimerica en la que uno de los monómeros contiene una molécula de inhibidor. El análisis de dicha estructura indica que posiblemente tienen lugar importantes cambios conformacionales en las lipoxigenasas de mamífero durante el proceso de interacción enzima-ligando. La elucidación del modo de asociación entre la lipoxigenasa y AA es importante para entender la regio- y estero- especificidad de una lipoxigenasa específica. Anteriormente se habían propuesto diferentes modelos del complejo ácido araquidónico-lipoxigenasa utilizando la estructura de la lipoxigenasa de las semillas de soja o modelos de la enzima humana obtenidos por homología a partir de la primera estructura cristalizada de la 15-LOX de conejo. En estos modelos el ácido araquidónico adopta una conformación extendida con su terminal metilo orientado hacia el fondo de la cavidad del centro activo y el grupo carboxilato orientado hacia la superficie. Esta conformación ratifica los resultados de experimentos de mutagénesis donde se indica que la Arg403 es esencial como punto de anclaje del extremo carboxilato del sustrato mientras que la cola hidrofóbica del ácido graso interaccionaría con los residuos Ile593, Phe353, Met419 e Ile418 del fondo de la cavidad. No obstante, la nueva estructura de la 15-LOX plantea la posibilidad de que el AA se halle en el centro activo de la enzima de otras maneras, como

por ejemplo, en conformaciones más plegadas denominadas horseshoe-like o incluso en una orientación invertida con el grupo carboxilato hacia el fondo de la cavidad. En la Figura 1 se han superpuesto dos de estas conformaciones (extendida y plegada) resultado de nuestros cálculos de docking refinados posteriormente con simulaciones de Dinámica Molecular. El análisis de esta diversidad conformacional es de gran importancia como punto de partida para establecer los diferentes modos de asociación enzima-sustrato y con las miras puestas en el diseño de inhibidores estructurales.



Las glutamato racemasas son enzimas esenciales en las primeras fases de la biosíntesis del peptidoglicano, que es un componente esencial de la membrana celular de las bacterias. La biosíntesis del peptidoglicano en las bacterias patógenas necesita el aminoácido D-glutamato, que es producido por las glutamato racemasas a partir del L-glutamato natural. Por tanto, las glutamato racemasas son dianas para la investigación de fármacos antibacterianos. De hecho, la biosíntesis de pared celular bacteriana ha conseguido actualmente la máxima utilidad clínica ya que el conjunto de inhibidores de este proceso representan más del 60% de todo el mercado antibacteriano, valorado en más de 25.000 millones de dólares.

En nuestro grupo de investigación de la UAB llevamos varios años estudiando estas enzimas y, concretamente en



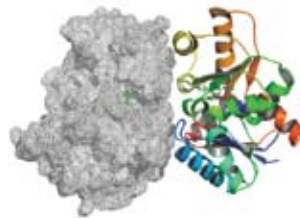
Esquema 2.

el caso de la glutamato racemasa de *Bacillus subtilis* hemos demostrado^{3,4} que la acción catalítica tiene lugar a través de una cuádruple transferencia protónica y que la eficiencia de esta reacción depende mucho de los estados de protonación de la enzima. Este proceso de racemización implica la desprotonación del hidrógeno- α de la molécula de glutamato seguida por la correspondiente reprotonación del sustrato por la cara estereoquímicamente opuesta. Estudios de mutagénesis han demostrado que son dos cisteínas los residuos ácido/base catalíticos. Lo sorprendente de la enzima glutamato racemasa es que consigue catalizar este proceso cuando el pKa del hidrógeno- α es mayor de 21 en disolución acuosa mientras que el pKa de la cadena lateral de una cisteína en agua es tan sólo de 8.4. Las dos cisteínas presentan por tanto sus átomos de azufre protonados a pH neutro. ¿Cómo pueden entonces estas cisteínas actuar como bases, la Cys74 en la dirección D \rightarrow L y la Cys185 en la dirección L \rightarrow D? Nuestro análisis de la superficie de

energía potencial QM/MM con un modelo del complejo enzima-sustrato solvatado ha verificado que la racemización se produce gracias a la asistencia de dos residuos (Asp10, His187) contiguos a las dos cisteínas, Cys74 y Cys185, que las desprotonan previamente a la correspondiente abstracción del hidrógeno- α del glutamato en las direcciones D \rightarrow L y L \rightarrow D, respectivamente. El esquema 2 muestra la cuádruple transferencia protónica que transforma el D-glutamato en L-glutamato.

También hay que tener en cuenta que los valores de pKa de los diferentes grupos ácido/base en un entorno enzimático pueden estar muy perturbados respecto a sus valores en disolución acuosa. Además, este proceso catalítico en concreto se puede clasificar como un ejemplo de *substrate-assisted catalysis* (SAC), es decir como un proceso en el cual uno o más grupos del propio sustrato contribuyen a acelerar la reacción catalítica. En el caso de la glutamato racemasa es el grupo amonio del sustrato glutamato el que "cataliza" la acción catalítica de la enzima.

El grupo amonio del sustrato cargado positivamente se mueve a lo largo del camino de reacción de forma concertada con cada transferencia protónica (aunque en sentido inverso) de manera que facilita el proceso estabilizando electrostáticamente los diferentes intermedios del mismo. En la Figura 2 se muestra la estructura del dímero de la glutamato racemasa del *Bacillus subtilis* indicando la localización de los centros activos de la enzima.



Actualmente estamos trabajando también en la simulación mediante técnicas de Dinámica Molecular de la enzima glutamato racemasa de *Helicobacter pylori* que es una bacteria que infecta el estómago humano. Para más de la mitad de la población, esta bacteria se considera la causa principal de la gastritis crónica y de diferentes tipos de úlcera. La

compañía farmacéutica AstraZeneca ha descubierto inhibidores que actúan mediante un muy sorprendente mecanismo alostérico que requiere también la presencia del sustrato. La molécula de inhibidor no compite con el sustrato pero necesita que el glutamato esté enlazado a la enzima para que se de inhibición. El objetivo de nuestras simulaciones moleculares consiste en analizar cómo, en presencia del sustrato y de la molécula de inhibidor, la enzima experimenta un cambio conformacional que no permite la salida del producto de la racemización. En particular la propuesta experimental es que la asociación con la molécula de inhibidor provoca un desplazamiento de una hélice- α C-terminal que resulta en una mayor estabilización de una conformación cerrada de la enzima bloqueando la salida de producto.

Espero que el trabajo de nuestro grupo y de otros similares nos lleve al alba de una nueva era en la cual las sinergias de los enfoques teórico y experimental nos permitan dar un paso de gigante en el desarrollo de nuevos fármacos.

1. Tejero, A. González-Lafont y J.M. Lluch. A PM3/d Specific Reaction Parameterization for Iron Atom in the Hydrogen Abstraction Catalyzed by Soybean Lipoygenase-1. *Journal of Computational Chemistry* 28, 997-1005 (2007).
2. I. Tejero, M. García-Viloca, A. González-Lafont, J.M. Lluch y D.York. Enzyme Dynamics and Tunneling Enhanced by Compression in the Hydrogen Abstraction Catalyzed by Soybean Lipoygenase-1. *Journal of Physical Chemistry B* 110, 24708-24719 (2006).
3. E. Puig, M. García-Viloca, A. González-Lafont, J.M. Lluch y M.J. Field. New insights in the Reaction Mechanism Catalyzed by Glutamate Racemase Enzyme: pH Titration Curves and Classical Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Physical Chemistry B* 111, 2385-2397 (2007).
4. E. Puig, E. Mixcoha, M. García-Viloca, A. González-Lafont y J.M. Lluch. How the Substrate D-glutamate Drives the Catalytic Action of *Bacillus subtilis* glutamate racemase. *Journal of the American Chemical Society*. Accepted. (2009).