



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Simulaciones biomoleculares de algunas enzimas relevantes
en procesos inflamatorios: 15-LOX, 5-LOX y COX-2.
Aplicación al estudio de mecanismos y al diseño de
inhibidores.**

Alejandro Cruz Saez

Tesis Doctoral

Programa de doctorado en Química

Supervisores:

José María Lluch López

Àngels González Lafont

Departament de Química

Facultat de Ciències

2022



José M. Lluch López, Catedràtic del Departament de Química, i Àngels González Lafont, Catedràtica del Departament de Química, certifiquem que

Alejandro Cruz Saez ha realitzat sota la nostra direcció, en el Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, el treball d'investigació titulat:

**Simulaciones biomoleculares de algunas enzimas relevantes
en procesos inflamatorios: 15-LOX, 5-LOX y COX-2.
Aplicación al estudio de mecanismos y al diseño de
inhibidores.**

que es presenta en aquesta memòria per optar al grau de Doctor en Química.
I perquè consti als efectes escaients, signem aquest certificat a Bellaterra a 15 de juny de
2022, mitjançant la validació d'aquest document pdf.

Dr. José M. Lluch López

Dra. Àngels González Lafont

Agradecimientos

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su soporte científico y humano han colaborado en la realización de esta tesis.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores Dr. José M. Lluch López y Dra. Àngels González Lafont la gran oportunidad de haber podido realizar este trabajo aquí, han depositado una gran confianza en mí y me han apoyado mediante su gran dedicación, comprensión y ayuda.

Por otra parte, mis agradecimientos a mis compañeros de despacho y a los dos técnicos que todos ellos me han ayudado a resolver todos los problemas que han ido surgiendo a lo largo de mi tesis doctoral.

No puedo olvidarme de mis amigos Álvaro y Eduardo que, aunque en estos últimos tiempos no nos hayamos visto mucho, siempre han estado ahí y cuyo apoyo siempre ha sido muy importante.

Por último y no menos importante, quiero dar las gracias a mi familia, en especial a mis padres, Antonio y Olga, y a mis abuelos, Carmen y Marcos, por apoyarme siempre de manera incondicional en cuanto me he propuesto, animarme en los momentos más difíciles y ayudarme siempre que lo he necesitado.

Muchas gracias a todos.

Alejandro

“Chemistry must become the astronomy of the molecular world”

Alfred Werner

Índice

I	Introducción	1
1	Introducción	1
1.1	Perspectiva general	2
1.2	Lipoxigenasas	4
1.2.1	Clasificación	4
1.2.2	Estructura	5
1.2.3	Actividades catalíticas de las Lipoxigenasas	10
1.2.4	Rol biológico de las lipoxigenasas	13
1.3	Ciclooxigenasas	17
1.3.1	Estructura	18
1.3.2	Unión de sustratos al centro activo COX	21
1.3.3	Metabolitos de las ciclooxigenasas	24
1.3.4	Función biológica y patologías asociadas	26
1.3.5	NSAIDs	27
II	Fundamento Teórico	36
2	Fundamento Teórico	37
2.1	Preámbulo	37
2.1.1	Cálculos de <i>docking</i>	38
2.1.2	Mecánica Molecular	41
2.1.3	Dinámica Molecular	44
2.1.4	Mecánica Cuántica	48
2.1.5	Métodos QM/MM	53
2.1.6	Cálculos de energía de Gibbs	59
III	Objetivos	61

3	Objetivos	62
IV	Resultados y Discusión	65
4	Detalles moleculares del mecanismo de formación de lipoxinas en la ruta biosintética de 5(<i>S</i>),15(<i>S</i>)-diHpETE catalizada por la 15-LOX-1 de reticulocito	66
4.1	Introducción.....	66
4.2	Metodología.....	68
4.3	Resultados y discusión.....	72
4.3.1	Cálculos de <i>docking</i> de 5(<i>S</i>),15(<i>S</i>)-diHpETE y 5(<i>S</i>),15(<i>S</i>)-diHETE.....	72
4.3.2	Simulaciones de MD de 5(<i>S</i>),15(<i>S</i>)-diHpETE y 5(<i>S</i>),15(<i>S</i>)-diHETE.....	73
4.3.3	Cálculos QM/MM.....	77
4.4	Conclusiones.....	89
5	Desorden instantáneo en los complejos de Michaelis enzima-sustrato para calcular la barrera de energía de Gibbs de una reacción enzimática	91
5.1	Introducción.....	91
5.2	Base teórica.....	93
5.3	Hidrólisis de un enlace glicosídico catalizada por la enzima <i>Thermus thermophilus</i> β - <i>glycosidase</i>	98
5.3.1	Detalles metodológicos para la enzima <i>Thermus thermophilus</i> β - <i>glycosidase</i>	100
5.3.2	Resultados para Ttb-gly <i>wild-type</i>	101
5.3.3	Resultados para el mutante Y284P Ttb-gly.....	102
5.4	Reacciones de abstracción de hidrógeno del AA catalizadas por la 15-LOX-1 de conejo.....	103
5.4.1	Detalles metodológicos para la enzima 15-LOX-1 de conejo.....	104
5.4.2	Resultados para las reacciones de abstracción de hidrógeno del AA.....	105
5.5	Conclusiones.....	111
6	Estudio de las propiedades alostéricas del dímero de 15-LOX-1	112
6.1	Introducción.....	112
6.2	Heterogeneidad conformacional y efectos cooperativos de la de la 15-LOX de mamífero.....	117
6.2.1	Metodología.....	117
6.2.2	Resultados.....	119
6.2.3	Conclusiones.....	127
6.3	Papel de la Gln596 en la especificidad, estabilidad proteica y propiedades alostéricas de la 15-LOX de mamífero.....	128
6.3.1	Metodología.....	128

6.3.2	Resultados.....	130
6.3.3	Conclusiones.....	148
6.4	Mecanismo de acción de N-Substituted 5-(1H-Indol-2-yl)-2-methoxyanilines que son inhibidores alostéricos de la actividad oxigenasa del LA de las 15-LOX de mamífero	149
6.4.1	Metodología.....	149
6.4.2	Resultados.....	151
6.4.3	Conclusiones.....	167
7	Diseño racional de inhibidores específicos de la COX-2 que incorporen un fotointerruptor tipo azobenceno	169
7.1	Introducción.....	169
7.2	Metodología	170
7.3	Resultados.....	173
7.3.1	Simulación de MD para el complejo h-COX-2-celecoxib	173
7.3.2	Cálculos de <i>docking</i> y simulación de MD del complejo h-COX-2-rofecoxib	176
7.3.3	Cálculos de <i>docking</i> y simulaciones de MD para el candidato 0 del celecoxib	177
7.3.4	Obtención de candidatos prometedores mediante cálculos de <i>docking</i>	179
7.3.5	Simulaciones de MD para los candidatos prometedores de mayor potencial.....	188
7.3.6	Conclusiones.....	193
8	Estudio del mecanismo de formación de LTA₄ en la ruta biosintética de AA catalizada por la 5-LOX humana	195
8.1	Introducción.....	195
8.2	Metodología	196
8.3	Resultados.....	199
8.3.1	Comparación estructural de h-5-LOX <i>wild-type</i> con human <i>Stable-5-LOX</i> y simulación de MD de relajación de h-5-LOX <i>wild-type</i>	199
8.3.2	Cálculos de <i>docking</i> de AA	201
8.3.3	Simulación de MD del complejo h-5-LOX-AA	204
8.3.4	Cálculos QM/MM	209
8.3.5	Conclusiones.....	221
V	Conclusiones Generales	222
9	Conclusiones Generales	223
	Bibliografía	225

Lista de acrónimos y siglas

LOXs	Lipoxigenasas (X-LOX para referirse a sus isoformas)
h-5-LOX	5-LOX humana
COXs	Ciclooxigenasas (COX-X para referirse a sus isoformas)
h-COX-2	COX-2 humana
SPMs	Mediadores lipídicos proresolutivos especializados
AA	Ácido araquidónico
LA	Ácido linoleico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
DHA	Ácido docosahexaenoico
NSAIDs	Medicamentos antiinflamatorios no esteroideos
COXIBs	Medicamentos antiinflamatorios selectivos de la COX-2
ABs	Azobencenos
FLAP	Proteína activadora de la 5-LOX
PLAT	<i>Polycystin1 Lipoygenase Alpha Toxin</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Arg	Arginina
His	Histidina
Lys	Lisina
Asp	Aspartato
Glu	Glutamato
Ser	Serina
Thr	Treonina
Asn	Asparagina
Gln	Glutamina
Cys	Cisteína
Sec	Selenocisteína
Gly	Glicina
Pro	Prolina
Ala	Alanina
Val	Valina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Tyr	Tirosina
Trp	Triptófano
PCET	<i>Proton Coupled Electron Transfer</i>
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenoico
diHETE	Ácido dihidroxieicosatetraenoico
triHETE	Ácido trihidroxieicosatetraenoico
HpETE	Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
diHpETE	Ácido dihidroperoxieicosatetraenoico

triHpETE	Ácido trihidroperoxieicosatetraenoico
HODE	Ácido hidroxiocetadecadienoico
HpODE	Ácido hidroperoxioctadecadienoico
LTs	Leucotrienos
LTA₄	Leucotrieno A ₄
LTB₄	Leucotrieno B ₄
LTC₄	Leucotrieno C ₄
LTD₄	Leucotrieno D ₄
LTE₄	Leucotrieno E ₄
cys-LTs	Leucotrienos cisteínicos
LXs	Lipoxinas
LXA₄	Lipoxina A ₄
LXB₄	Lipoxina B ₄
EET	Ácido 14,15-epoxieicosatrienoico
LDLs	Lipoproteínas de baja densidad
HDLs	Lipoproteínas de alta densidad
NAFLD	Enfermedad hepática del hígado graso no alcohólico
PGs	Prostaglandinas
PGG₂	Prostaglandina G ₂
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGI₂	Prostaciclina
TXA₂	Tromboxano A ₂
PGHS	Prostaglandina-endoperóxido sintasas
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
centro activo POX	Centro activo peroxidasa
centro activo COX	Centro activo ciclooxigenasa
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G específicas
brABs	Diazocinas
MM	Mecánica molecular
QM	Mecánica cuántica
MD	Dinámica molecular
QM/MM	Mecánica cuántica/Mecánica molecular
GA	Algoritmo genético
BPTI	<i>Bovine pancreatic trypsin inhibitor</i>
GPU	Unidades de procesamiento gráfico
PBC	Condiciones de frontera periódicas
PES	Superficie de energía potencial
NPT	Colectividad isotérmica-isobárica
NVT	Colectividad canónica
TS	Estado de transición
DFT	Teoría del funcional de la densidad

LDA	<i>Local Density Approximation</i>
LSDA	<i>Local Spin Density Approximation</i>
GGA	<i>Generalized Gradient Approximation</i>
PMF	Potencial de fuerza media
FEP	<i>Free Energy Perturbation</i>
US	<i>Umbrella Sampling</i>
WHAM	<i>Weight Histogram Analysis Method</i>
L-BFGS	<i>Limited-memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shano</i>
P-RFO	<i>Partitioned rational function optimizer</i>
HDLCOpt	<i>Hybrid delocalized internal coordinate scheme</i>
ECP	<i>Effective core potential</i>
MEP	Camino de mínima energía
Ttb-gly	<i>Thermus thermophilus β-glycosidase</i>
SCC-DFTB	<i>Self-Consistent Charge Density Functional Tight-Binding</i>
pNP-Fuc	4-nitrofenil β -D-fucopiranososa
Fuc	Fucosa
pNP	4-nitrofenol
BnON(Me)-Glc	<i>N-methyl-O-benzyl-N-(β-D-glucopyranosyl)-hydroxylamine</i>
PAGE	<i>Native polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate native polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro
PISA	<i>Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies</i>
CD	Dicroísmo circular
GdnHCl	Cloruro de guanidinio
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i>
RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media
SEM	Error estándar de la media
PBS	Tampón fosfato salino
RP-HPLC	<i>Reversed-phase high-performance liquid chromatography</i>
CP-HPLC	<i>Chiral-phase high-performance liquid chromatography</i>
NP-HPLC	<i>Normal-phase high-performance liquid chromatography</i>
SAR	Relación estructura actividad
PPA	Ácido polifosfórico
ETYA	Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico

Debido a que se ha utilizado la nomenclatura estándar de tres letras para los aminoácidos, éstos no han sido introducidos en el texto.

Debido a la temática de la tesis, los grupos funcionales de los compuestos HETE, diHETE, triHETE, HpETE, diHpETE, triHpETE, HODE y HpODE no tienen una posición fija y a lo largo del texto aparecen múltiples variantes de dichos compuestos.

Por claridad, en el texto sólo se han introducido algunos de estos ácidos y en la presente lista únicamente figura el nombre de éstos sin especificar la posición de los sustituyentes.

Cabe la posibilidad de que algunos acrónimos no hayan sido introducidos la primera vez que aparecen en el texto por cuestiones técnicas, sin embargo, han sido introducidos poco después de su primera aparición. En caso de duda siempre se puede consultar la presente lista.

Dado que cierto material que aparece en determinados capítulos/secciones ha sido publicado en diversas revistas científicas, a continuación, se procede a realizar el debido reconocimiento de éstas:

Chapter 4 has been reprinted with permission from *J. Phys. Chem. B*, **2020**, 124, 50, 11406–11418. Copyright 2022 American Chemical Society.

Chapter 5 has been reproduced from Ref. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2021**, 23, 13042–13054 with permission from the PCCP Owner Societies.

Part of Chapter 6, mainly section 6.2, has been reproduced from *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22(6), 3285.

Part of Chapter 6, mainly section 6.3, was published in *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865, Alejandro Cruz, Almerinda Di Venere, Giampiero Mei, Alexander Zhuravlev, Alexey Golovanov, Sabine Stehling, Dagmar Heydeck, José M. Lluch, Àngels González-Lafont, Hartmut Kuhn, Igor Ivanov, A role of Gln596 in fine-tuning mammalian ALOX15 specificity, protein stability and allosteric properties, 158680, Copyright ScienceDirect (**2020**).

Part of Chapter 6, mainly section 6.4, has been reprinted with permission from *J. Med. Chem.* **2022**, 65, 3, 1979–1995. Copyright 2022 American Chemical Society.

Parte I

Introducción

Capítulo 1

Introducción

1.1 Perspectiva general

La inflamación aguda¹⁻³ es la primera reacción protectora iniciada por el huésped contra patógenos o daño tisular, que consiste en una fase inicial, seguida de una fase de resolución. Por lo tanto, la inflamación es una respuesta beneficiosa del huésped para eliminar los patógenos invasores y/o reparar el tejido lesionado con el objetivo de restaurar la homeostasis. Tanto la fase inicial de la inflamación aguda como su fase de resolución son procesos coordinados complejos altamente regulados que involucran la interacción de diferentes tipos de células en el espacio y en el tiempo. Si la inflamación aguda no se resuelve adecuadamente, evoluciona a inflamación crónica, que está relacionada con una gran cantidad de enfermedades como asma, diabetes, cáncer, Alzheimer, Parkinson, enfermedades cardiovasculares e incluso la COVID-19⁴⁻⁸. De hecho, hoy en día, más del 50% de todas las muertes pueden ser atribuibles a enfermedades relacionadas con la inflamación. Por esta razón, es claro que aumentar nuestra comprensión sobre este tema es esencial. Dos oxidorreductasas que tienen un papel clave en la inflamación aguda y han sido diana por parte de tratamientos contra enfermedades derivadas de la inflamación son las lipoxigenasas (LOXs) y las ciclooxigenasas (COXs), ya que sus rutas metabólicas están relacionadas con la síntesis de mediadores lipídicos proresolutivos especializados^{5,9,10} (SPMs), que regulan la fase de resolución, y los mediadores lipídicos proinflamatorios, que regulan la fase inicial de la inflamación aguda.

Por un lado, las LOXs son una familia de dioxigenasas, que no contienen azufre y cuyo hierro no pertenece a un grupo hemo, que catalizan la hidroperoxidación altamente regioespecífica y estereoespecífica de ácidos grasos poliinsaturados que contienen unidades de 1,4-*Z,Z*-pentadieno (metileno bisalílico). Las LOXs están ampliamente extendidas

entre los diferentes reinos de organismos como animales, plantas, hongos y bacterias¹¹. Además, hay un gran número de isoformas de las LOXs conocidas. En el caso particular de los seres humanos, seis genes funcionales codifican para lipoxigenasas. El ácido araquidónico (AA) es el principal sustrato de las LOXs de mamíferos, cuya hidroperoxidación inicia la biosíntesis de mediadores lipídicos que tienen un papel fundamental en la inflamación y en la salud humana en general. Cabe destacar que no sólo los metabolitos del AA tienen propiedades proinflamatorias y antiinflamatorias, sino que los metabolitos de ácidos grasos omega-3 tales como ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) también poseen propiedades antiinflamatorias.

Por otro lado, las COXs son una familia de hemoproteínas bifuncionales homodiméricas asociadas a la membrana que catalizan la oxigenación, que es también altamente regioespecífica y estereoespecífica como en el caso de las LOXs, de varios ácidos grasos poliinsaturados^{12,13}. Por el contrario, tanto en humanos como en animales, las COXs están presentes solamente en tres isoformas¹⁴: 1) la COX-1 que se expresa constitutivamente por todo el cuerpo, incluyendo en plaquetas y células endoteliales; 2) la COX-2 que es principalmente inducida por inflamación, aunque también se encuentra como constitutiva en regiones específicas como los riñones, el intestino y el cerebro; 3) la COX-3 que es constitutiva, pero su presencia está limitada al sistema nervioso central y a la pared aórtica. Además, existe cierta controversia en torno a si la COX-3 es simplemente una variación de la COX-1 o no. De manera similar a las LOXs, el AA es el sustrato preferido de las COXs, aunque, otros ácidos grasos también experimentan la oxigenación por parte de estas enzimas. La COX-2 ha sido un objetivo farmacológico debido al hecho de que cataliza la conversión del AA en prostaglandinas G₂ (PGG₂) y H₂ (PGH₂), cuya producción está relacionada con muchas patologías humanas tales como inflamación, fiebre e incluso cáncer¹⁴⁻¹⁷.

Por esta razón, los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) se han utilizado ampliamente para inhibir la COX-2. Los NSAIDs tradicionales solían ser o bien no selectivos o bien inhibidores preferentes de la COX-1, eliminando la protección gástrica en el estómago proporcionada por las prostaciclinas lo cual origina no sólo sangrado gastrointestinal y formación de úlceras pépticas, sino que también origina problemas de riñón. Sin embargo, los NSAIDs no ulcerogénicos selectivos de la COX-2 (COXIBs), como celecoxib y rofecoxib, han sido desarrollados y puestos en el mercado, pero producen efectos secundarios cardiovasculares. En estado de homeostasis, el equilibrio entre los tromboxanos derivados de la COX-1 en las plaquetas y las prostaciclinas derivadas de la COX-2 constitutiva (no está claro si en el riñón o en el recubrimiento endotelial de los vasos sanguíneos) dan lugar a un equilibrio agregación/antiagregación de las plaquetas. Sin embargo, cuando estos COXIBs bloquean la formación de las prostaciclinas permitiendo la prevalencia de los tromboxanos dan lugar a la posible aparición de trombos sanguíneos. Debido al enorme potencial de los NSAIDs para tratar patologías humanas, sería muy interesante desarrollar nuevos NSAIDs que no presenten estos efectos secundarios¹⁸⁻²⁰. De hecho, recientemente, se han llevado a cabo estudios para valorar la actividad terapéutica y los efectos secundarios del compuesto AD732 (*E-4-β-(4-methylphenyl)-5-hydroxyliminomethyl-1H-pyrazol-1-yl*benzenesulfonamide), un nuevo derivado de la familia de los COXIBs que contiene el grupo pirazol. Los resultados obtenidos son prometedores, ya que este compuesto parece conservar los efectos

antiinflamatorios y analgésicos disminuyendo significativamente los efectos secundarios típicos asociados a los COXIBs²¹.

Una forma de eludirlos sería desarrollar nuevos NSAIDs que sólo actúen sobre la región donde se encuentra la patología humana a tratar. Aunque parezca muy complicado, se podría hipotéticamente conseguir mediante la inserción de un fotointerruptor en los NSAIDs ya desarrollados hasta la fecha. Un fotointerruptor es un tipo de molécula que sufre un cambio reversible bajo el efecto de la luz de una longitud de onda específica. Respecto a la mayoría de ellos, este cambio reversible consiste en una isomerización *trans(E)-cis(Z)* de un doble enlace que provoca grandes alteraciones de volumen/forma de la molécula en cuestión. Este hecho se puede aprovechar para desarrollar nuevos fármacos que cambien sus afinidades hacia sus dianas terapéuticas mediante la irradiación con radiación electromagnética, ya que mostrarían una forma activa, que encajaría dentro de su diana, y otra inactiva, que no encajaría dentro de su diana. Además, hay que señalar que hay dos posibilidades una vez que el fotointerruptor se ha activado y ha cesado la luz que lo ha activado: 1) el fotointerruptor decae térmicamente a su estado más estable termodinámicamente, que tiene que ser inactivo desde un punto de vista farmacológico para ser viable; 2) es desactivado a voluntad usando luz de longitud de onda apropiada. Teniendo todo en cuenta, los fotointerruptores proporcionan un mecanismo para activar el medicamento exactamente **cuándo** y **dónde** se necesite, evitando los bien conocidos efectos secundarios. Considerando la estructura de los COXIBs¹⁸⁻²⁰, se puede entrever que los azobencenos (ABs)²² y grupos similares son una familia de fotointerruptores muy prometedora desde el punto de vista de incorporarlos dentro de la estructura de esta clase NSAIDs.

1.2 Lipoxigenasas

1.2.1 Clasificación

Antes de nada, es importante remarcar que no hay una clasificación inequívoca de las LOXs ya que existen diversas isoformas y se pueden tener en cuenta diversos criterios a la hora de clasificarlas, tales como su reactividad, su presencia en los tejidos o incluso la relación evolutiva que guardan entre sí. Como se ha dicho previamente, el AA es el sustrato principal de las LOXs de mamíferos y una posible clasificación de éstas sería de acuerdo con que posición del AA oxigenan. Esta clasificación es viable debido a que la oxigenación por parte de las LOXs es altamente regioespecífica y estereoespecífica. Con el objetivo de formar un dieno conjugado tras la oxigenación, las posiciones donde la molécula de oxígeno entrante puede atacar, tras la abstracción de hidrógeno inicial, son 5, 8, 9, 11, 12 y 15. Aunque en la naturaleza predominan fundamentalmente las isoformas 5-LOXs, 8-LOXs, 12-LOXs y 15-LOXs (Figura 1)²³⁻²⁸. Por otra parte, esta clasificación se puede acompañar con la estereoquímica del producto, es decir, *S* o *R*. Aunque como la mayoría de las oxigenaciones se suelen producir con estereoquímica *S*, ésta generalmente se omite y sólo se indica cuando la oxigenación tiene lugar con estereoquímica *R*. Además, esta clasificación incluso se puede complementar con el tejido donde la isoforma considerada aparece.

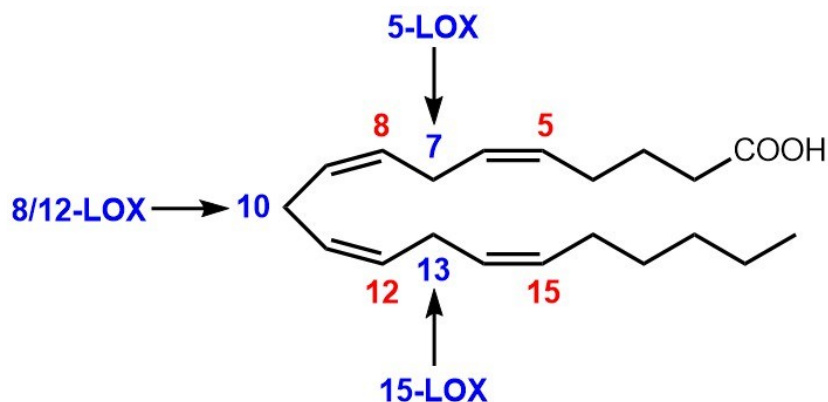


Figura 1. Clasificación de las LOXs de mamíferos según la posición del AA que oxigenan. Los números en rojo indican las diferentes posiciones donde una molécula de oxígeno puede atacar para formar el hidropéroxido derivado. Los números en azul indican las diferentes posiciones donde se puede producir la abstracción de hidrógeno inicial. Además, también se ha indicado la isoforma de las LOXs que actuaría sobre dichas posiciones.

Aunque posiblemente esta clasificación sea la más empleada, presenta dos claras limitaciones. La primera es que, a parte del AA, hay otros ácidos grasos, como por ejemplo el ácido linoleico (LA), que pueden servir como sustrato para las LOXs y éstas además pueden presentar diferente especificidad en relación con estos otros sustratos. Mientras que la segunda limitación sería que esta clasificación basada en la posición donde se produce la oxigenación en el AA no tiene en cuenta aspectos evolutivos, es decir, diferentes isoformas de las LOXs de organismos diferentes que comparten un alto grado de relación evolutiva pueden tener una regioespecificidad diferente en relación con un mismo sustrato, cosa que haría que, aplicando estrictamente esta clasificación, estas isoformas no guarden relación alguna entre sí.

A pesar de sus inconvenientes, a lo largo de esta tesis se va a emplear la clasificación basada en la posición donde se produce la oxigenación del AA en mamíferos.

1.2.2 Estructura

Las LOXs están constituidas por una única cadena polipeptídica que se pliega en una estructura con dos dominios bien diferenciados^{29,30}: un pequeño dominio N-terminal que está involucrado en la regulación de la actividad catalítica y en la unión a la membrana celular y un dominio catalítico C-terminal grande que contiene la cavidad donde se unen los ácidos grasos y el átomo de hierro catalítico que no forma parte de un grupo hemo³¹. Hay que notar que, aunque estos monómeros son plenamente funcionales, es bien conocido que la actividad de la 5-LOX se ve reducida considerablemente si ésta no actúa en presencia de la proteína activadora de la 5-lipoxigenasa (FLAP)³² y que más recientemente se ha podido determinar experimentalmente que tanto la 5-LOX humana como la 15-LOX-1 de conejo y humana forman dímeros³³⁻³⁵.

Tomando como referencia la estructura canónica de las LOXs (Figura 2), el dominio N-terminal consiste en un barril β compuesto por 8 láminas β antiparalelas que presenta un alto grado de conservación estructural. Actualmente, este dominio se conoce como PLAT (*Polycystin1 Lipoxygenase Alpha Toxin*) aunque inicialmente recibió el nombre de “C2-like domain” (*Coactosin-like protein*) debido al parecido que guarda con el dominio de las fosfolipasas que es responsable de la unión a la membrana celular y que está regulado por iones Ca^{2+} . Por otra parte, el dominio C-terminal, que es el mayor y más conservado desde un punto de vista estructural de los dos, está compuesto por unas 20 hélices α que están interrumpidas por un pequeño subdominio de láminas β . Estos dos dominios están separados por una región formada por bucles, aunque se puede apreciar que estos dos dominios forman un plano de contacto. Cabe destacar que esta estructura canónica que acabamos de presentar se encuentra en todas las isoformas de las LOXs, aunque hay pequeñas diferencias, sobre todo en el dominio catalítico que es el que proporciona a cada isoforma sus propiedades catalíticas diferenciadoras.

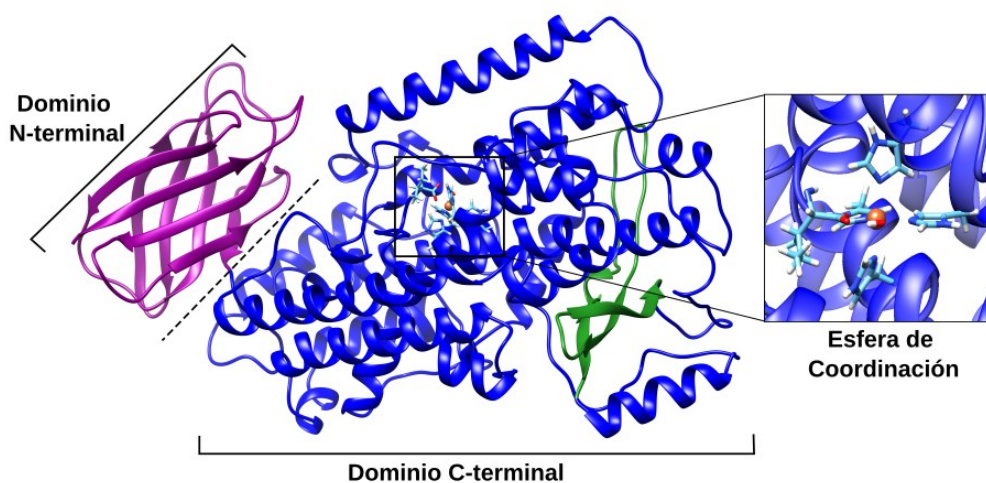


Figura 2. Representación de la estructura canónica de las LOXs (monómero A de 15-LOX-1). El dominio N-terminal está indicado en magenta mientras que el dominio C-terminal está indicado en azul oscuro donde su pequeño subdominio de láminas β está descrito en verde. La línea discontinua representa el plano de contacto interdominio. El cuadro de la derecha muestra la esfera de coordinación del átomo de hierro en detalle donde las cadenas laterales de los residuos que la forman están representadas en *stick*.

1.2.2.1 15-Lipoxigenasa-1

Por desgracia, no se ha logrado obtener la estructura cristalográfica de la 15-LOX-1 humana de reticulocito o al menos no se ha publicado todavía. Disponer de esta estructura sería interesante para conseguir una mejor comprensión de los procesos inflamatorios.

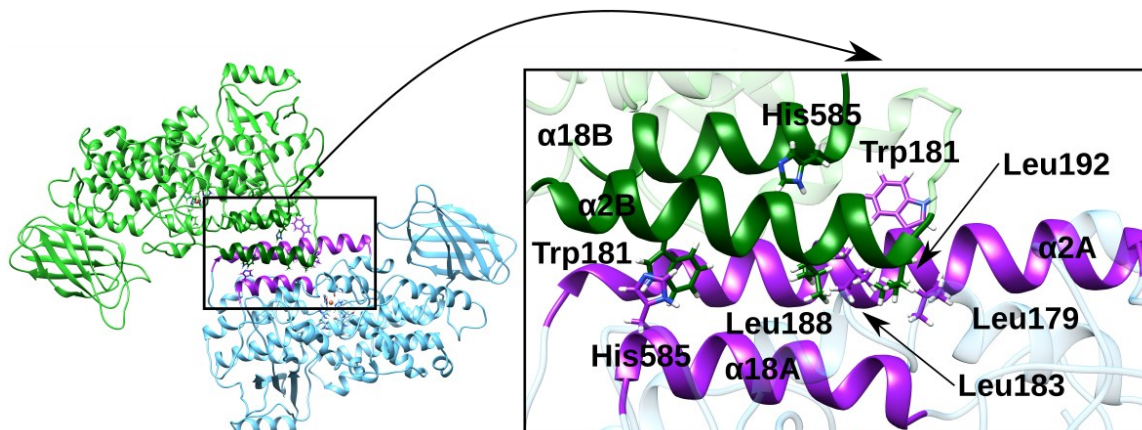


Figura 3. Representación del dímero 15-LOX-1 de conejo. El monómero A está indicado en azul mientras que sus hélices $\alpha 2$ y $\alpha 18$ están representadas en lila. En cambio, el monómero B está indicado en verde mientras que sus hélices $\alpha 2$ y $\alpha 18$ están representadas en verde oscuro. La esfera de coordinación del átomo de hierro para ambos monómeros y los residuos más importantes para la estabilidad de la interfase del dímero están representados en *stick*. El cuadro a la derecha muestra una visión detallada de la interfase del dímero.

Sin embargo, sí que se dispone de la estructura análoga de la 15-LOX-1 de conejo^{29,36,37} (ver Figura 3) cuya secuencia coincide en un 80% con la humana. La estructura cristalográfica más reciente de la 15-LOX-1 (*PDB code* 2P0M)³⁷ corresponde a un dímero que fue cristalizado en presencia del inhibidor RS7. Es importante notar que esta estructura más reciente, no es más que una reinterpretación de la que obtuvieron Gillmor *et al.*²⁹ corrigiendo el grupo espacial del cristal (pasando del grupo R32 al grupo R3). Esta corrección permitió obtener la estructura de la hélice $\alpha 2$, que tiene un papel fundamental tanto en la interfase del dímero como en la forma de la cavidad donde se coloca el sustrato. Dicho dímero está formado por dos monómeros estructuralmente diferentes A y B que interactúan el uno con el otro mediante sus hélices $\alpha 2$ y $\alpha 18$, las cuales conformarían la interfase del dímero. Como veremos más adelante con más detalle, el monómero A regula alostéricamente el monómero B gracias a la interfase que los une, ya que si ésta se rompe, dicha regulación no tiene lugar^{38,39}. En esta interfase, destacan las interacciones que se establecen entre las Leu179/Leu183 de la hélice $\alpha 2$ del monómero A y las Leu188/Leu192 de la hélice $\alpha 2$ del monómero B, las cuales forman un clúster hidrofóbico que tiene una conformación *zipper* donde las cadenas laterales de las leucinas de un monómero entran en contacto directo con las cadenas laterales de las leucinas del otro monómero. Además, el Trp181 de la hélice $\alpha 2$ de un monómero puede interactuar con la His585 de la hélice $\alpha 18$ del otro monómero (Figura 3). Todas estas interacciones son las que estabilizan la formación del dímero³⁸. Por otra parte, cabe destacar que cálculos de energía de Gibbs en relación con el proceso de dimerización indican que de todos los posibles dímeros, la combinación A+B es la termodinámicamente más estable³⁵. El monómero B, que contiene el inhibidor, presenta una conformación cerrada mientras que el monómero A, que tiene la cavidad vacía, presenta una conformación abierta. La presencia de este inhibidor induce una serie de cambios conformacionales en el monómero B que son especialmente notables en las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 18$, ya que la disposición espacial

del resto de elementos de la estructura secundaria es muy similar entre los monómeros A y B. Con relación a la hélice $\alpha 2$, ésta se desplaza unos 12 Å respecto a su homóloga en el monómero A y se acorta, mientras que la hélice $\alpha 18$ experimenta una reorganización menor con respecto a su orientación relativa a las otras hélices α de la proteína. De hecho, los aminoácidos 169-176 de la hélice $\alpha 2$ pierden esta estructura helicoidal (Figura 4). En relación con el dominio catalítico, lo más destacado es que este dominio está constituido por 18 hélices α , donde las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 18$ tienen un papel fundamental en la forma de la cavidad donde se une el sustrato, y que la esfera de coordinación de los átomos de hierro catalíticos está formada por cuatro histidinas (His361, His366, His541 y His545) y el carboxilato de la Ile663 terminal.

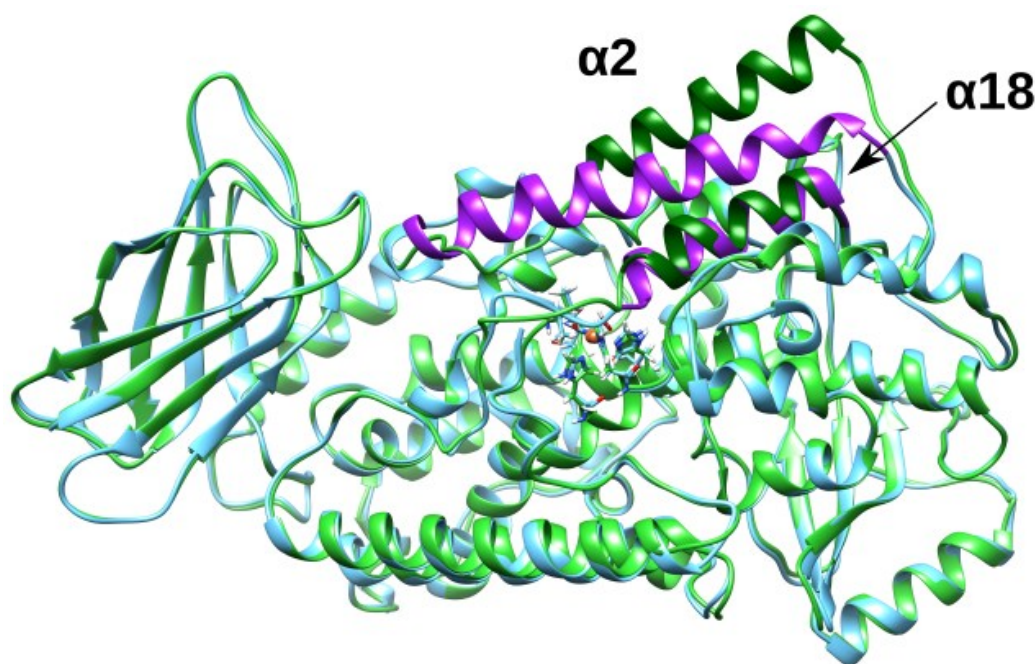


Figura 4. Superposición del monómero A (en azul) y del monómero B (en verde) del dímero 15-LOX-1 de conejo. Las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 18$ están indicadas en lila para el monómero A y en verde oscuro para el monómero B. La esfera de coordinación del átomo de hierro está representada en *stick*.

1.2.2.2 5-Lipoxigenasa

Aunque se han obtenido diferentes estructuras cristalográficas para la 5-LOX humana (h-5-LOX), ninguna de éstas corresponde a la 5-LOX humana *wild-type* sino que corresponden a la denominada *human Stable-5-LOX* (PDB code 3O8Y)⁴⁰. Esta 5-LOX modificada es una mutante de la 5-LOX humana que ha sido solubilizada y estabilizada con el objetivo de mejorar su cristalización, más concretamente, esta mutante carece de los aminoácidos que hipotéticamente se encargan de la inserción de la enzima en la membrana celular, cosa que aumenta su solubilidad, y contiene la triple mutación Lys653Glu-Lys654Asn-Lys655Leu, que está basada en la secuencia de aminoácidos de la 8R-LOX de coral⁴¹. Esta triple mutación, que la dota de estabilidad no altera los rasgos reactivos característicos de la forma *wild-type*. Además, también se introdujo la doble

mutación Cys240Ala-Cys561Ala, debido a que se predijo que estas cisteínas estarían próximas en la estructura de la 5-LOX y podrían inducir algún tipo de desestabilización menor adicional. Cabe destacar que con esta estructura se han obtenido resultados muy interesantes que han ayudado a comprender mejor el mecanismo catalítico de la 5-LOX⁴². Con el objetivo de profundizar todavía más, un posible paso adicional sería intentar comprender qué papel juegan los aminoácidos que se encargan de la inserción en la membrana y la secuencia desestabilizante que contiene tres lisinas consecutivas, pero obviamente para poder lograr esto sería necesario disponer de la estructura de la 5-LOX humana *wild-type*. Recientemente, DeepMind y EBL's *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI) han desarrollado un sistema basado en inteligencia artificial, AlphaFold, que predice las coordenadas tridimensionales de todos los átomos pesados para una proteína dada a partir de su secuencia de aminoácidos. La diferencia fundamental con los enfoques computacionales previos es que éste es el primero que es capaz de predecir las estructuras proteicas con una precisión cercana a la experimental en la mayoría de los casos y además es extensible a proteínas de gran tamaño⁴³. Entonces, para poder realizar este estudio adicional se ha utilizado la estructura de la 5-LOX humana *wild-type* proporcionada por AlphaFold (Figura 5).

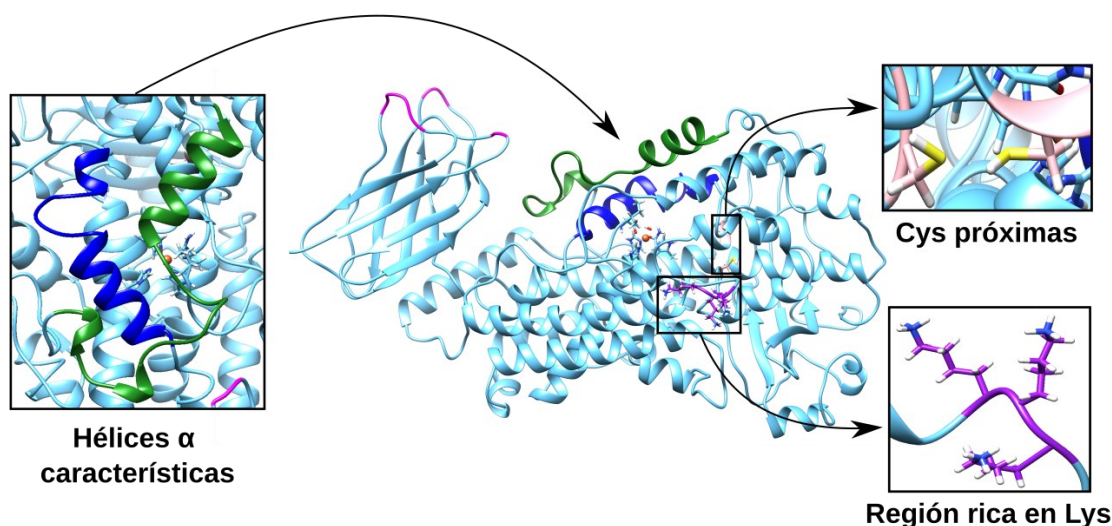


Figura 5. Representación de la estructura de la h-5-LOX *wild-type* predicha por AlphaFold. Los residuos que supuestamente se encargan de la inserción de membrana están indicados en magenta, la hélice $\alpha 2$ y la hélice arqueada $\alpha 8$ están indicadas en verde y azul oscuro, respectivamente (cuadro izquierdo). La región que contiene tres lisinas consecutivas está indicada en lila (cuadro inferior derecho), mientras que el par de cisteínas que se predijo que estarían próximas está indicado en rosa (cuadro superior derecho). La esfera de coordinación del átomo de hierro, las tres lisinas consecutivas y las cisteínas próximas están representadas en *stick*.

A parte de la secuencia desestabilizante que contiene tres lisinas consecutivas, la estructura de la h-5-LOX contiene algunos rasgos distintivos adicionales que se salen de la estructura canónica de la LOXs. En su dominio catalítico, la hélice $\alpha 8$ está arqueada y se ha propuesto que controla el acceso de oxígeno a la cavidad proteica. Por otra parte,

el plegamiento de la hélice $\alpha 2$ es totalmente diferente ya que, en las LOXs, esta hélice acostumbra a presentar seis o siete espiras y constituye un lado del centro activo. En cambio, en el caso de la 5-LOX, la hélice $\alpha 2$ presenta dos segmentos helicoidales que son perpendiculares entre sí y están separados por una región de bucles. Esta disposición diferencial de la hélice $\alpha 2$ causa que la cavidad de la h-5-LOX sea muy diferente del resto de cavidades de las otras LOXs. Finalmente, es interesante notar que su esfera de coordinación del átomo de hierro difiere de la esfera de la 15-LOX-1 (la otra lipoxigenasa que se ha estudiado en esta tesis). Se conservan tres histidinas (His367, His372 y His550) y el carboxilato de la isoleucina terminal (Ile673), en cambio, la histidina restante (His545) es sustituida por una asparagina (Asn554).

1.2.3 Actividades catalíticas de las Lipoxigenasas

En general, las LOXs muestran la actividad oxigenasa/lipoxigenasa, que consiste en oxigenar ácidos grasos poliinsaturados a sus derivados hidroperóxido, aunque algunas isoformas bajo determinadas condiciones de reacción también muestran la actividad lipohidroperoxidasa, que consiste en convertir hidroperóxidos lipídicos a productos secundarios de peroxidación lipídicos. Cabe destacar que varias isoformas de las LOXs exhiben ambas actividades e incluso muestran una actividad adicional, la actividad leucotrieno sintasa. Este sería el caso de la 15-LOX-1 de conejo y la 5-LOX humana⁴⁴⁻⁴⁶. Dicha actividad leucotrieno sintasa puede ser considerada una combinación de las dos actividades catalíticas de las LOXs, la cual conduce a la formación de un ácido graso oxigenado biradical que se estabiliza vía la formación de un epóxido.

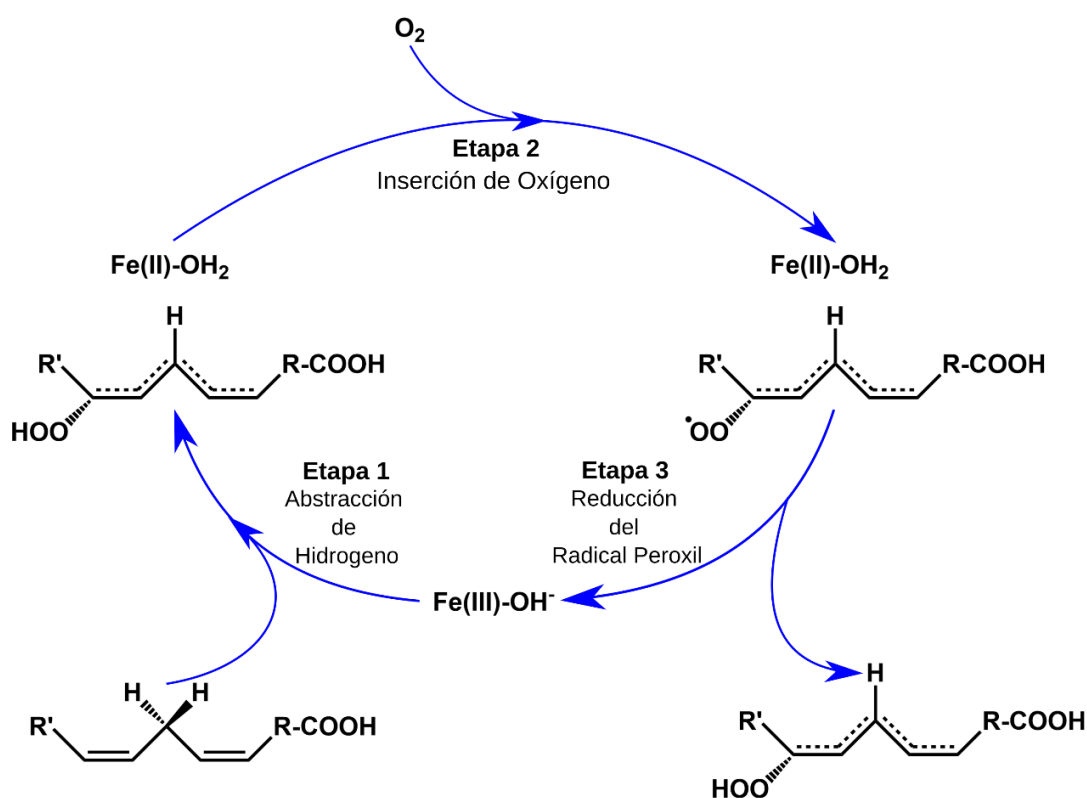


Figura 6. Etapas elementales de la actividad lipoxigenasa de las lipoxigenasas.

La actividad oxigenasa/lipoxigenasa se compone de tres pasos/etapas elementales: 1) abstracción de hidrógeno; 2) inserción de oxígeno; 3) reducción del radical peroxilo (Figura 6). El primer paso consiste en una abstracción de hidrógeno de una unidad 1,4-*Z,Z*-pentadieno de un ácido graso por parte del cofactor Fe(III)-OH⁻ para producir un radical pentadienilo, donde existe una deslocalización electrónica que lo estabiliza, y el cofactor Fe(II)-OH₂. Se ha postulado que esta etapa es la determinante de la velocidad. Por otra parte, se ha podido elucidar que el proceso de abstracción de hidrógeno realmente corresponde a un proceso de *Proton Coupled Electron Transfer* (PCET)^{47,48}, siendo el Fe(III) el aceptor del electrón y el grupo hidroxilo el aceptor del protón. En gran medida, esta etapa determina tanto la regioespecificidad como la estereoespecificidad del proceso de hidroperoxidación global, ya que ambas especificidades dependen altamente de qué unidad 1,4-*Z,Z*-pentadieno del ácido graso transfiere el átomo de hidrógeno y de cuál de los dos átomos de hidrógeno candidatos a la abstracción de dicha unidad (pro-*S* y pro-*R*) es transferido. Es importante notar que si diversos átomos de hidrógeno pueden ser abstraídos, tanto la distancia del átomo de hidrógeno respecto al cofactor Fe(III)-OH⁻ como la orientación de éste en relación a dicho cofactor son los factores cruciales que van a determinar qué átomo de hidrógeno es el preferido. Para una LOX y un ácido graso dados, estos dos factores son determinados por la profundidad y el ancho de la cavidad donde se une el ácido graso y por la orientación del ácido graso al entrar en dicha cavidad. Todo esto, es lo que confiere a cada isoenzima de las LOXs su regioespecificidad y estereoespecificidad características para cada sustrato. La segunda etapa consiste en el ataque de un oxígeno molecular al radical pentadienilo produciendo un radical peroxilo. Cabe destacar que la abstracción de hidrógeno y la inserción de oxígeno suelen tener lugar en caras opuestas del plano definido por la unidad 1,4-*Z,Z*-pentadieno^{49,50}. Normalmente, se hace un abuso del lenguaje y se dice que estos dos procesos ocurren de manera antarafacial, mientras que si éstos tuvieran lugar por la misma cara del plano definido por la unidad 1,4-*Z,Z*-pentadieno se diría que ocurren de manera suprafacial. Por simplicidad, a lo largo de esta tesis vamos a emplear esta terminología. El tercer y último paso de la actividad oxigenasa consiste en la reducción del radical peroxilo por parte del cofactor Fe(II)-OH₂ transfiriendo un átomo de hidrógeno. Esta transferencia produce el hidroperóxido final y regenera el cofactor Fe(III)-OH⁻. Es importante notar que para que tenga lugar esta transferencia es necesario que el radical peroxilo pase de una configuración antarafacial inicial a una configuración suprafacial de manera que el radical peroxilo se acerque al cofactor Fe(II)-OH₂. Aunque esta actividad catalítica tiene como sustratos preferidos los ácidos grasos poliinsaturados, también puede actuar sobre fosfolípidos, ésteres de colesterol e incluso biomembranas y lipoproteínas. Además, si el ácido graso de partida contiene diversas unidades 1,4-*Z,Z*-pentadieno entonces, éste constituye un sustrato que puede experimentar una oxigenación doble (si contiene dos unidades) o triple (si contiene tres unidades). Un ejemplo de este tipo de sustratos sería el bien conocido AA, que contiene tres unidades 1,4-*Z,Z*-pentadieno consecutivas, el cual mediante una oxigenación triple catalizada por la 5-LOX y la 15-LOX-1 sería convertido en diferentes isómeros de lipoxinas (LXs) tras la acción de una reductasa (5,6,15-triHETE o 5,14,15-triHETE).

Por otra parte, en relación a la actividad lipohidroperoxidasa, que es capaz de descomponer lípidos que contienen al menos un grupo hidroperóxido en una mezcla compleja de productos de peroxidación lipídicos bajo ciertas condiciones de reacción⁵¹, donde esta mezcla puede contener cetodienos, aldehídos de cadena corta, compuestos con epóxidos e hidróxidos, hidrocarburos volátiles y dímeros de ácidos grasos^{52,53}, poco es conocido respecto a los diferentes mecanismos de reacción que conducen a los diferentes productos que acabamos de mencionar. Lo que sí está claro, es que el cofactor Fe(III)-OH⁻ es fundamental para que esta actividad tenga lugar y que su átomo de hierro va experimentando cambios en su estado de oxidación. Es importante notar que en presencia de ácidos grasos que contienen hidroperóxidos y de ácidos grasos no oxigenados, donde ambos contienen al menos una unidad 1,4-*Z,Z*-pentadieno, la actividad lipohidroperoxidasa compite con la actividad lipoxigenasa, aunque en condiciones fisiológicas la actividad lipoxigenasa es la dominante.

Finalmente, la actividad leucotrieno sintasa, que sería capaz de convertir ácidos grasos que contienen un grupo hidroperóxido (como 5-HpETE o 15-HpETE) en leucotrienos (LTs) que contienen un epóxido, consiste en dos pasos/etapas elementales: 1) abstracción de hidrógeno; 2) escisión homolítica del peróxido y formación del epóxido y de una molécula de agua (Figura 7). Cabe destacar que todo y que la segunda etapa se podría descomponer en tres más simples, esto conllevaría una barrera de energía de Gibbs superior para el proceso global, es decir, el acoplamiento de estos tres procesos simples estabiliza el proceso global resultante de manera que presenta una barrera de energía de Gibbs menor que cualquiera de los tres procesos independientes.

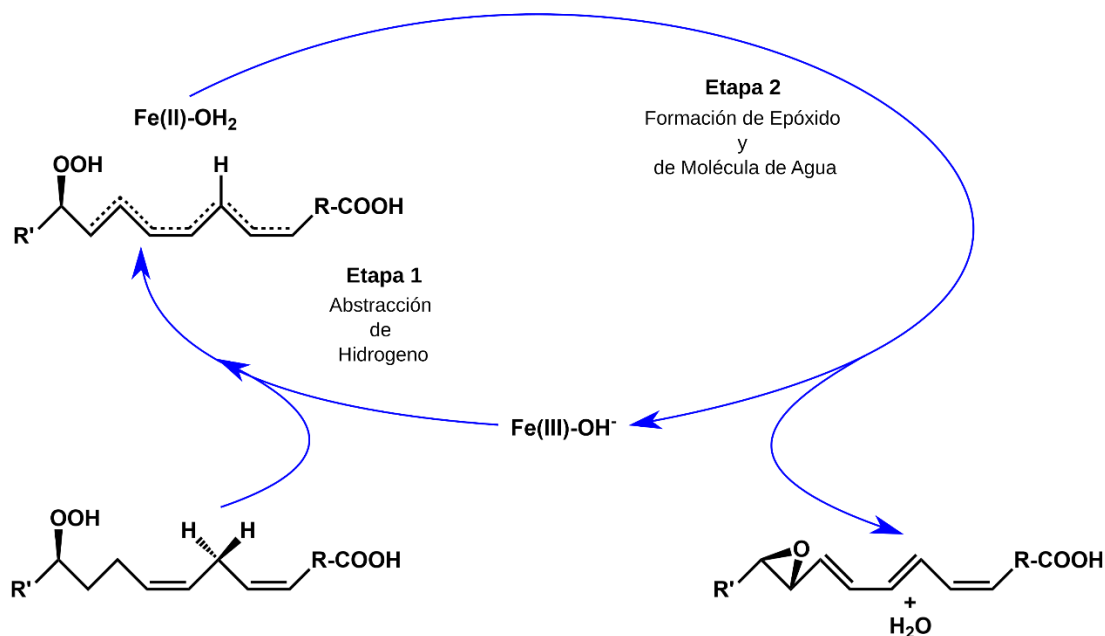


Figura 7. Etapas elementales de la actividad leucotrieno sintasa de las lipoxigenasas.

1.2.4 Rol biológico de las lipoxigenasas

1.2.4.1 Metabolitos de las lipoxigenasas

En mamíferos, el AA puede ser metabolizado mediante tres rutas enzimáticas diferentes produciendo mediadores lipídicos proinflamatorios y SPMs. Estas tres rutas son: la ruta de las COXs, la ruta de las enzimas P450 y la ruta de las LOXs⁵⁴. Dado que en esta tesis únicamente se ha estudiado la actividad catalítica de las LOXs, nos vamos a centrar en la ruta de dichas enzimas. La ruta de las LOXs es responsable de la producción de ácidos eicosatetraenoicos con grupos hidroperóxido e hidróxido (HpETEs y HETEs, respectivamente), leucotrienos (LTs) y lipoxinas (LXs).

La síntesis de ácidos grasos insaturados con dobles enlaces más allá del C₁₀ a partir de elementos más simples no se observa en mamíferos. Esta limitación biosintética es la causa de que los mamíferos tengan que ingerir determinados ácidos grasos esenciales para no tener deficiencias nutricionales. Por lo tanto, el AA proviene de la dieta ya sea mediante la ingestión directa de éste o a partir de los ácidos linoleico o linoléico (ácidos grasos de dieciocho carbonos, con dos y tres dobles enlaces, respectivamente) por la acción de las enzimas desaturasas y elongasas sobre dichos ácidos grasos. En el organismo de los mamíferos, el AA se puede encontrar o bien en los triglicéridos o bien en las diferentes membranas lipídicas.

La ruta metabólica de las LOXs comenzaría con la hidrólisis de lípidos que conforman membranas lipídicas por parte de la fosfolipasa-A₂, liberando ácidos grasos poliinsaturados. Una vez liberado el AA, las diferentes isoformas de las LOXs lo transforman en los derivados hidroperóxidos correspondientes, que prosiguen su transformación hasta generar los mediadores de señalización lipídicos. Esta posterior transformación puede tener lugar mediante la LOX que ha generado el hidroperóxido en cuestión, otra isoforma de las LOX u otra enzima que no pertenezca a la familia de las LOXs. Cabe destacar que los leucotrienos y las lipoxinas tienen un papel destacado dentro de los metabolitos que se generan a partir del AA siguiendo la ruta metabólica de las LOXs (Figura 8).

Por una parte, los leucotrienos son potentes mediadores lipídicos de la respuesta proinflamatoria, cuyo nombre fue acuñado por el bioquímico sueco Bengt Samuelsson en el año 1979⁵⁵ y deriva de *leukocyte*, tipo celular donde fueron descubiertos, y *triene*, ya que estos compuestos presentan tres dobles enlaces conjugados. Se pueden distinguir dos clases principales de éstos, los leucotrienos que no contienen péptidos (LTA₄ y LTB₄) y los leucotrienos que sí contienen péptidos (LTC₄, LTD₄ y LTE₄), estos últimos se denominan leucotrienos cisteínicos (cys-LTs) ya que contienen cisteína o un derivado de ésta. La biosíntesis de los LTs es iniciada por la 5-LOX, que cataliza la conversión del AA a leucotrieno A₄ (LTA₄) en una reacción de dos pasos (una hidroperoxidación seguida de una epoxidación). LTA₄ es el precursor del resto de LTs, ya que contiene un grupo epóxido que lo hace poco estable y hace que actúe como un intermedio en la formación del resto de leucotrienos. Posteriormente, LTA₄ es transformado a leucotrieno B₄ (LTB₄) por la acción de la LTA₄ hidrolasa o a leucotrieno C₄ (LTC₄) por la acción de la LTC₄ sintasa, donde LTC₄ puede ser convertido a leucotrieno D₄ (LTD₄) y posteriormente a

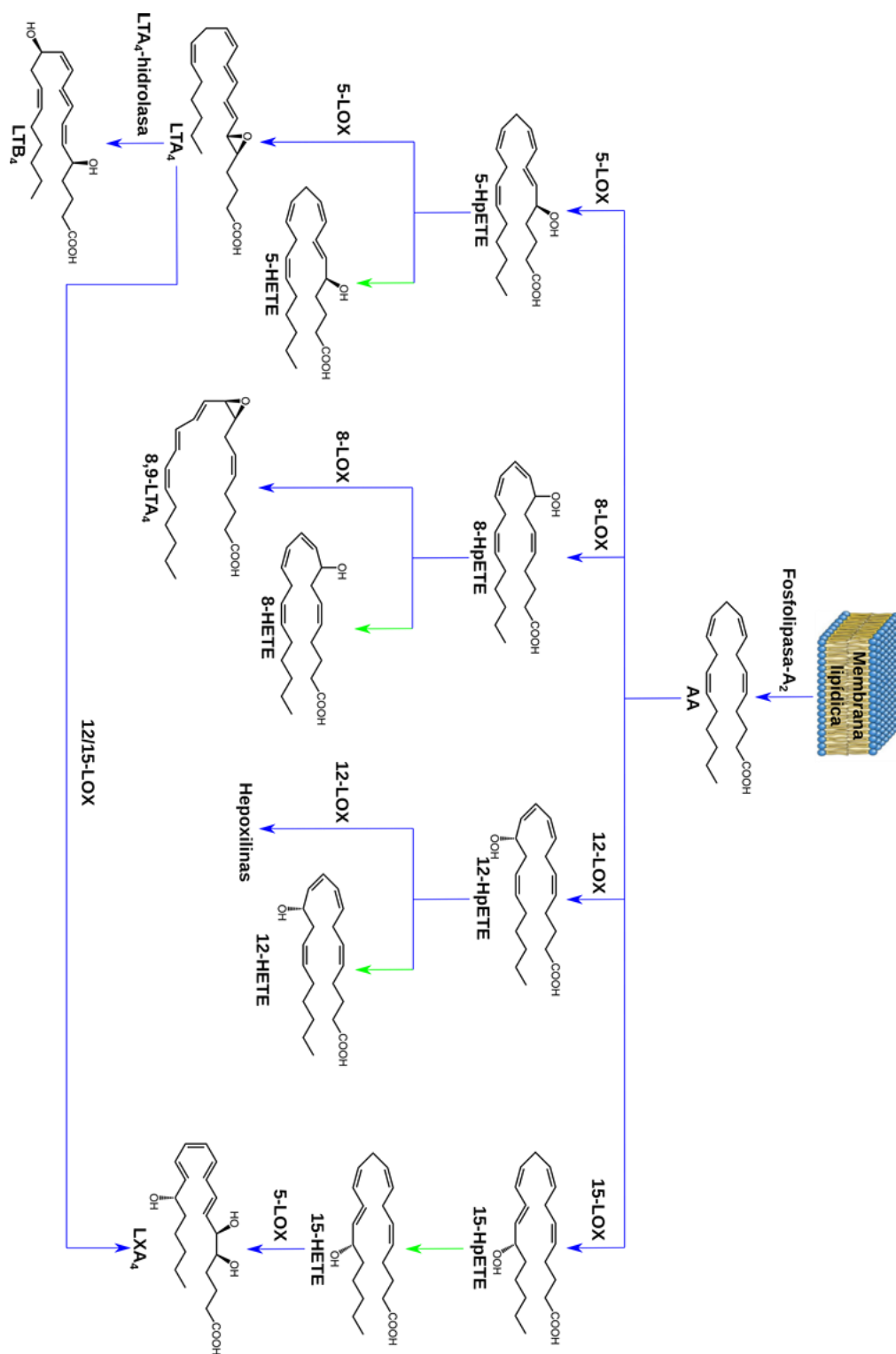


Figura 8. Ruta metabólica propuesta del ácido araquidónico mediante la actividad catalítica de las LOXs. Las reacciones que tienen lugar por medio de una reductasa han sido indicadas con una flecha en verde. Con el objetivo de hacer más fácilmente comprensible la figura, no se ha incluido la estructura explícita de las hepoxilinas, ni tampoco se han incluido los leucotrienos cisteínicos (ver texto). La estereoquímica del grupo hidropéroxido de 8-HpETE y del grupo hidróxido de 8-HETE no se ha indicado porque existen 8-LOXs tanto *R* (por ejemplo, la de coral) como *S* (por ejemplo, la de ratón).

leucotrieno E₄ (LTE₄) una vez se encuentra fuera de la célula. LTB₄ es uno de los agentes quimiotácticos y proinflamatorios más potentes⁵⁶, el cual induce permeabilidad vascular, adhesión de neutrófilos a la pared vascular, quimiotaxis y la migración de leucocitos al sitio donde se ha producido la lesión. Además, se une a diferentes receptores que estimulan a las células inflamatorias. Es importante notar que todos estos procesos son funciones relacionadas con la inflamación. En cambio, los leucocitos que contienen péptidos son agentes espasmogénicos que están relacionados con patologías alérgicas⁵⁶⁻⁵⁸.

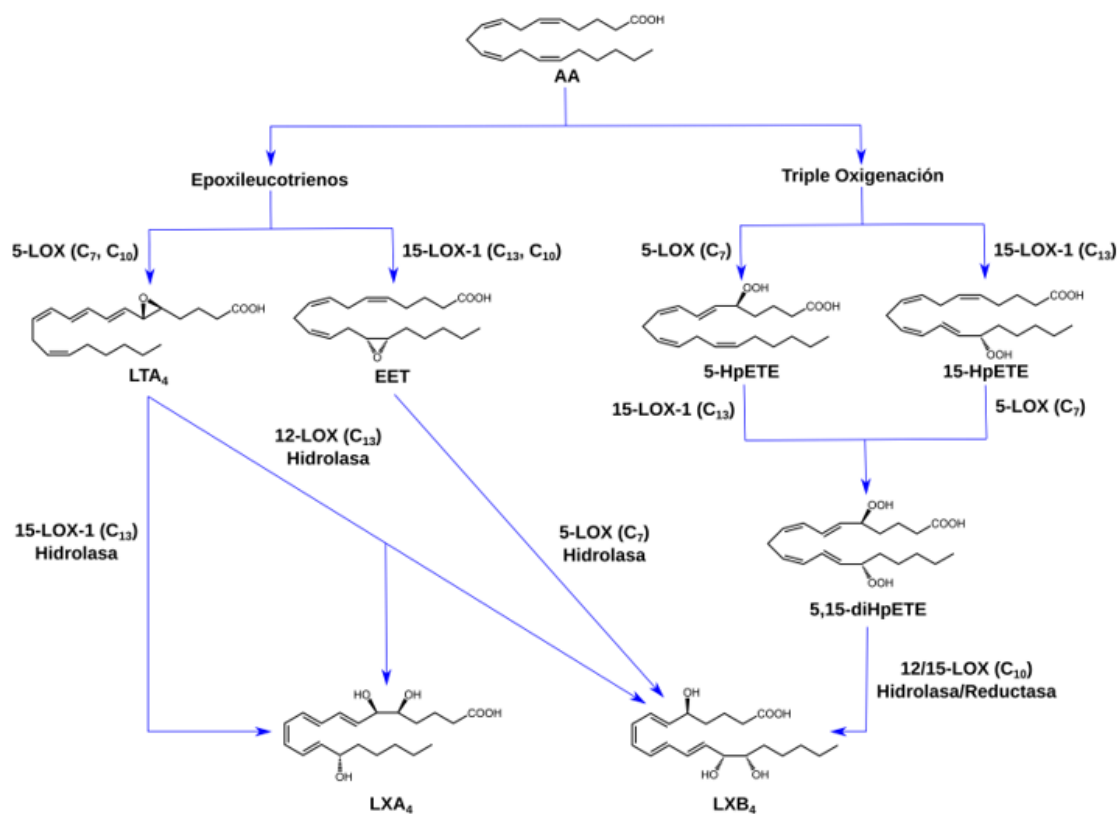


Figura 9. Mecanismos biosintéticos principales propuestos para la formación de lipoxinas. El átomo de carbono cuyo átomo de hidrógeno es abstraído está indicado a continuación de la isoforma de las LOXs que llevaría a cabo la reacción.

Por otra parte, la fase de resolución de la inflamación aguda era considerada un proceso pasivo que tenía lugar mediante el decaimiento de las señales proinflamatorias. Sin embargo, durante la primera década del siglo XXI, hubo un cambio en este paradigma y actualmente la fase de resolución de la inflamación se considera un proceso activo que está programado desde el inicio de la respuesta inflamatoria, cuyo objetivo es restituir la homeostasis del tejido donde ha tenido lugar la inflamación⁵⁸. En este proceso de resolución, los SPMs tienen un papel destacado, induciendo procesos antiinflamatorios tales como una migración menor de leucocitos⁵⁹, vuelta de la permeabilidad vascular a la normalidad⁶⁰, apoptosis de neutrófilos⁶¹ e inducción⁶⁰ de los macrófagos a fagocitar ciertas células proinflamatorias⁶². Estos compuestos incluyen lipoxinas^{63,64}, resolvinas⁶⁵, protectinas⁶⁶ y maresinas⁶⁷. Es importante notar que estos compuestos que acabamos de destacar son productos de las LOXs, donde resolvinas, protectinas y maresinas provienen

del metabolismo del EPA y DHA (ácidos grasos omega-3) mientras que las lipoxinas, provienen del metabolismo del AA.

Las lipoxinas fueron descritas por primera vez por Samuelsson *et al.* en 1984⁶⁸ y su nombre proviene de *lipoxygenase interaction products*, ya que se concluyó que la síntesis de éstas requiere de más de una isoforma de las LOXs y además es transcelular⁶⁹. En principio, habría dos mecanismos biosintéticos principales que conducirían a la formación de lipoxinas¹¹: 1) la ruta de la triple oxigenación que convertiría el AA, vía el intermedio *5S,15S-dihydroperoxy-6E,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid* (5,15-diHpETE), en lipoxina B₄ (LXB₄) mediante tres oxigenaciones consecutivas catalizadas por 5-LOX, 12-LOX o 15-LOX; 2) la ruta de los epoxileucotrienos que involucraría LTA₄ o ácido 14,15-epoxieicosatrienoico (EET), el cual no es un leucotrieno como tal, aunque su estructura es muy similar a la de éstos, como intermedios, donde 5-LOX, 12-LOX o 15-LOX catalizarían las diferentes reacciones (Figura 9). Una estrategia prometedora para luchar contra la inflamación sería cambiar la especificidad de la 5-LOX a la de 12/15-LOX⁷⁰.

1.2.4.2 Función biológica y patologías asociadas

Las lipoxigenasas de mamífero ejercen su función biológica mediante tres mecanismos de acción: 1) formación de mediadores lipídicos que regulan el fenotipo funcional celular; 2) oxidación de lípidos esterificados y complejos lipoproteicos (tales como biomembranas o lipoproteínas) modificando su estructura y funcionalidad; 3) modificación del estado redox celular mediante la formación de peróxidos lipídicos, el cual es un importante regulador de la proliferación celular y de la expresión génica⁵⁸.

El papel que desempeñan las LOXs en la carcinogénesis es muy complejo y los efectos observados a veces son contradictorios. Se ha identificado la actividad de las lipoxigenasas en muchos procesos relacionados con la carcinogénesis tales como proliferación de células tumorales, metástasis, diferenciación, apoptosis, migración, invasión de células carcinógenas y angiogénesis^{71,72}. Además, se cree que los SPMs de las LOXs muestran propiedades anticancerígenas ya que la inflamación crónica es clave en la progresión de tumores⁷³. Con el objetivo de determinar la implicación de las LOXs en los diferentes tipos de cáncer, se han realizado bastantes estudios al respecto⁷⁴⁻⁷⁹. Entre estos tipos de cáncer destacan el colorrectal⁸⁰, el de mama⁸¹ y el de próstata⁸². Por un lado, en relación con los metabolitos de las LOXs, se ha identificado a *(5S,6E,8Z,11Z,14Z)-5-Hydroxyicoso-6,8,11,14-tetraenoic acid* (5-HETE) y *(5Z,8Z,10E,12S,14Z)-12-Hydroxyicoso-5,8,10,14-tetraenoic acid* (12-HETE) como agentes cancerígenos ya que inducen proliferación celular, adhesión celular, metástasis y angiogénesis^{83,84}. Sin embargo, el 13-HODE (*(9Z,11E,13S)-13-Hydroxyoctadeca-9,11-dienoic acid*), que es un metabolito que provienen del LA, resulta ser anticancerígeno ya que promueve la apoptosis⁸⁵. El patrón de expresión de las diferentes isoformas de las LOXs depende del tipo de tumor y de la fase en que se encuentre éste. Por ejemplo, en la fase temprana del cáncer colorrectal se expresa la 5-LOX, mientras que en las fases más tardías de éste, como la metástasis y la neovascularización, se expresa la 12-LOX⁵⁸.

Es importante notar que las LOXs tienen un papel destacado en el sistema cardiovascular y que están relacionadas con algunas patologías de éste, como por ejemplo la arterioesclerosis^{86,87}. Con respecto a esta enfermedad, la 15-LOX-1 es clave ya que oxida

lipoproteínas de baja densidad (LDLs) que presentan propiedades proarteriogénicas porque activan la respuesta inmune y son rápidamente fagocitadas por macrófagos del músculo liso que son entonces transformados en células espumosas. Estas células se acumulan en el espacio intravenoso (espacio subendotelial de las arterias) produciendo *fatty streaks*, las cuales son lesiones arterioescleróticas tempranas. Además, 15-LOX-1 también oxida lipoproteínas de alta densidad (HDLs) lo cual se considera que tienen un efecto proarterioesclerótico. Por otra parte, se ha relacionado también a 5-LOX con la arterioesclerosis, participando en las fases finales de la lesión vascular mediante la síntesis de LTB₄⁸⁸. Asimismo, 15-LOX-2 también parece participar en la arterioesclerosis, ya que se han encontrado altos niveles de esta isoforma en lesiones arterioescleróticas tardías⁸⁹. Las LOXs también están relacionadas con la regulación de la presión sanguínea, mediante 15-LOX-1⁹⁰, y con la inflamación vascular, mediante 5-LOX⁹¹.

Además, las LOXs guardan una estrecha relación con las enfermedades alérgicas, de las que podríamos destacar el asma⁹², la rinitis⁹³ y la conjuntivitis⁹⁴. Esta estrecha relación era previsible ya que las LOXs sintetizan metabolitos que en su gran mayoría tienen propiedades proinflamatorias o antiinflamatorias. Con respecto a la inflamación, entre todas las isoformas destacaría la 5-LOX, ya que genera LTA₄ que es el precursor de todos los demás LTs. Asimismo, se ha podido determinar que los cys-LTs intervienen en la anafilaxia y que son fundamentales en la patogénesis de enfermedades alérgicas. Por otra parte, las LOXs también tienen un papel destacado en el sistema nervioso central y en bastantes enfermedades de dicho sistema, tales como Parkinson, Alzheimer (donde tanto 5-LOX como 15-LOX-1 participan, pero su función no está clara^{95,96}) y derrame cerebral. Esta implicación de las LOXs en el sistema nervioso central es debida al hecho de que las neuronas son especialmente vulnerables al estrés oxidativo y que las LOXs están involucradas en patologías derivadas de dicho estrés. Finalmente, es importante notar que las LOXs también participan en procesos de desarrollo y proliferación celular tan importantes como la eritropoyesis⁹⁷ y el mantenimiento del *Stratum corneum*^{98,99}, que es la capa más externa de la epidermis y protege de infecciones, irritantes y la pérdida de agua. Incluso han sido asociadas a desordenes metabólicos como diabetes tipos 1 y 2, obesidad y enfermedad hepática del hígado graso no alcohólico (NAFLD)⁵⁸.

1.3 Ciclooxygenasas

Las ciclooxigenasas son enzimas bifuncionales asociadas a membrana que contienen un grupo hemo (Fe³⁺-protoporfirina IX), las cuales son clave en la señalización mediante lípidos debido a que éstas inician la biosíntesis de prostaglandinas (PGs) y del tromboxano A₂ (TXA₂). De hecho, estas enzimas son también conocidas como prostaglandina-endoperoxido sintasas (PGHS). Como se ha dicho anteriormente (ver sección 1.1), hay dos isoformas de las COXs, COX-1 y COX-2 que son codificadas por los genes *ptgs1* y *ptgs2*, respectivamente. Cronológicamente, la primera isoforma en ser purificada y clonada fue la COX-1^{100,101}. Estos acontecimientos sucedieron en 1976 y en 1988, respectivamente. Sin embargo, en 1991 varios grupos de investigación informaron sobre un nuevo gen con la misma actividad que COX-1, cosa que condujo al descubrimiento de la COX-2¹⁰²⁻¹⁰⁴. Tras una intensa labor de investigación, es conocido

que estas isoformas exhiben diferencias en algunas acciones fisiológicas y que presentan rutas biosintéticas ligeramente diferentes^{102,103,105}, aunque la mayor diferencia funcional entre ambas provendría de la diferente regulación del mecanismo de expresión de sus genes. Concretamente, la COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de tipos celulares, mientras que la COX-2 principalmente se induce mediante una amplia gama de compuestos tales como agentes inflamatorios, factores de crecimiento y promotores tumorales. A partir de este patrón de expresión, parece claro que, a grandes rasgos, la COX-1 proporciona las PGs necesarias para la homeostasis celular mientras que la COX-2, permite la señalización que regula el crecimiento y la diferenciación celulares o modula la respuesta inflamatoria a una lesión o infección. De hecho, esta implicación en la respuesta inflamatoria ha sido lo que ha motivado el estudio de las COXs en esta tesis, haciendo especial énfasis en la COX-2.

Antes de desarrollar la sección introductoria de las COXs, es importante notar que lo que se va a exponer en las secciones 1.3.1, 1.3.2 y 1.3.5.2 proviene de resultados experimentales de dichas enzimas y no de simulaciones de éstas.

1.3.1 Estructura

Los genes que codifican COX-1 y COX-2 dan lugar a cadenas proteicas que contienen entre 599 a 604 aminoácidos, donde el número de éstos depende del organismo e isoforma considerados. Para un organismo dado, las secuencias proteicas de ambas isoformas comparten un 60% de identidad. Sin embargo, COX-2 carece de 14 aminoácidos cercanos a su N-terminal que están presentes en COX-1, mientras que ésta, carece de una inserción de 18 aminoácidos cercana al C-terminal que está presente en COX-2. Todo esto provoca que la numeración de los residuos en ambas isoformas no coincida, cosa que dificulta su comparación. Para sortear dicha dificultad, se suele emplear la numeración correspondiente a COX-1 para ambas isoformas. Aunque la presente tesis se centra principalmente en la COX-2, se va a utilizar dicha convención con el objetivo de facilitar el seguimiento del texto.

Las COXs son proteínas homodiméricas, aunque estudios recientes parecen indicar que estas actúan como heterodímeros funcionales donde sólo uno de los monómeros contendría el grupo hemo necesario para desempeñar la actividad catalítica propia de la enzima. Entonces, según esta hipótesis, el monómero que contiene el grupo hemo actuaría como subunidad catalítica mientras que el monómero que no contiene dicho grupo actuaría como subunidad alostérica¹⁰⁶⁻¹¹⁴. Debido a que existe cierta controversia en torno a este tema y a que un monómero de cualquiera de las dos isoformas es activo si contiene el grupo hemo, en esta tesis se han considerado las COXs como monómeros con el grupo hemo ya que las conclusiones obtenidas con estos monómeros se podrán extrapolar en gran medida a los sistemas diméricos de las COXs y porque este tratamiento simplifica sustancialmente los cálculos a realizar.

Un monómero de COX cualquiera contendría tres dominios bien diferenciados: 1) el dominio N-terminal del factor de crecimiento epidérmico (EGF); 2) el dominio encargado de la unión a la membrana celular; 3) el dominio C-terminal catalítico (Figura 10). La función que desempeña el dominio del EGF no es clara, aunque se cree que puede estar involucrado en las interacciones entre monómeros o ayudar a estabilizar la conformación

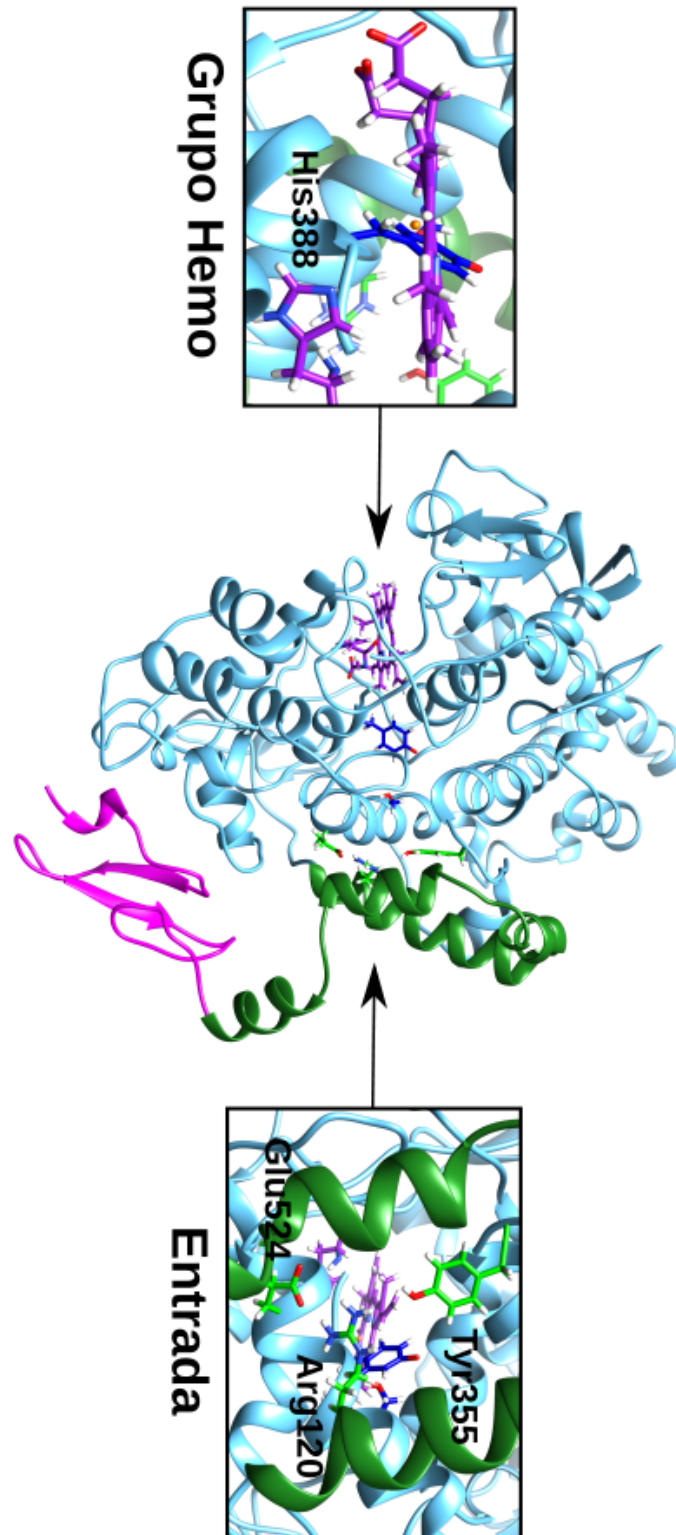


Figura 10. Representación de un monómero de COX. El dominio del EGF está indicado en magenta, el dominio de unión a membrana está indicado en verde oscuro y el dominio catalítico está indicado en azul claro. Los residuos que conforman la barrera de la entrada al centro activo COX están descritos en verde claro (cuadro derecho) mientras que el grupo hemo y la His a la cual se encuentra coordinado (cuadro izquierdo) están descritos en lila. Por otra parte, Tyr385 y Ser530 están descritos en azul oscuro. El grupo hemo y los residuos representados están indicados en *stick*.

del dominio encargado de la unión a la membrana. Cabe destacar que de la pequeña cantidad de láminas β que contienen las COXs, la mayoría se encuentra en este dominio. Por otra parte, el dominio de unión de membrana está formado por cuatro hélices α aproximadamente ortogonales entre ellas, que se denominan con una letra comprendida entre A y D, donde se acumulan el mayor número de variaciones entre ambas isoformas. Estas hélices α forman una especie de plano, la cara exterior del cual está constituida por residuos hidrofóbicos y sería responsable de la unión a membrana, mientras que la cara interior está compuesta de residuos hidrofílicos. Es importante notar que la hélice D penetra en el dominio catalítico, siendo determinante en la forma que adopta la cavidad de la proteína.

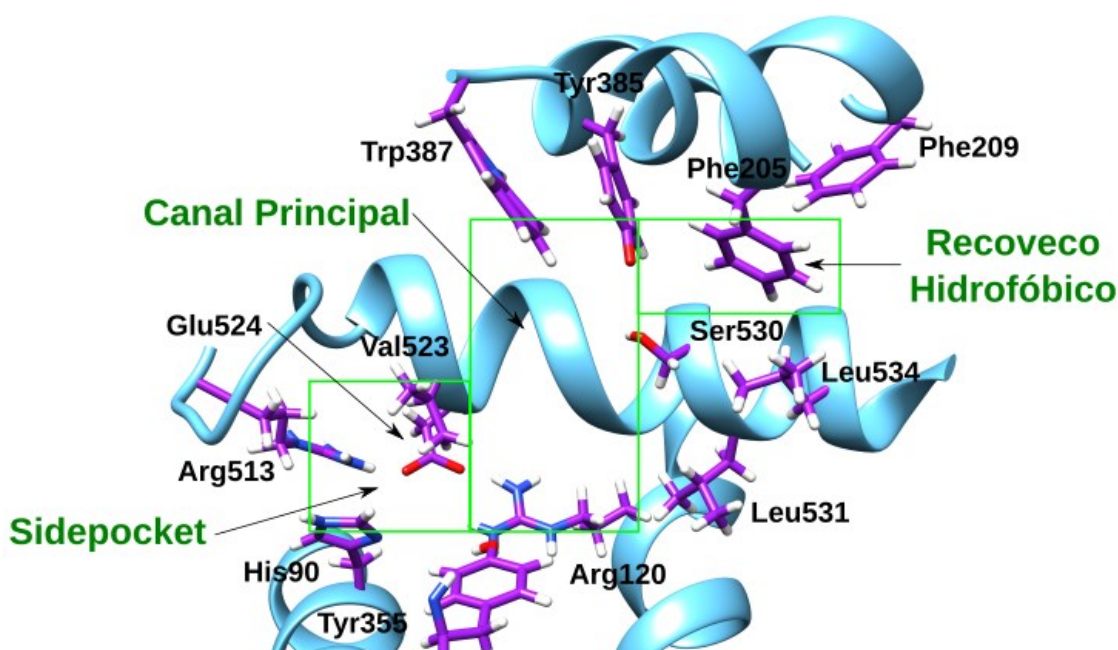


Figura 11. Representación esquemática del centro activo COX donde se han indicado sus tres cavidades principales y los residuos más representativos de éste. Se han representado los residuos que conforman la barrera de la entrada al centro activo COX (Arg120, Tyr355 y Glu524) para facilitar la ubicación de dicha entrada, que no ha sido indicada explícitamente aquí con el objetivo de hacer más comprensible la figura (ver Figura 15). Las cadenas laterales de los residuos están representadas en *stick*.

En último lugar, el dominio catalítico contiene tanto el centro activo peroxidasa (centro activo POX) como el centro activo ciclooxygenasa (centro activo COX). Por una parte, el centro activo POX viene definido por un *manejo* de siete hélices α (hélices 2, 8, 6, 17, 5, 11/12 y 16) y está situado al fondo de una hendidura superficial exponiendo el grupo hemo al solvente. Cabe destacar que este motivo estructural está presente en otras peroxidases que contienen un grupo hemo. Por otra parte, el centro activo COX (Figura 11) consiste en un canal en forma de L invertida fundamentalmente hidrofóbico que penetra profundamente en el dominio catalítico por encima del dominio de unión de membrana donde las cuatro hélices α de este dominio definen una cavidad espaciosa que recibe el nombre de entrada. La parte superior de dicha entrada está definida por Arg120, Tyr355 y Glu524, que forman una barrera que debe abrirse para permitir el acceso al

centro activo COX. Es importante notar que Arg120 y Glu524 son los únicos residuos cargados en este centro activo y que Arg120 y Tyr355 frecuentemente interactúan con ácidos carboxílicos u otros grupos funcionales polares de sustratos e inhibidores.

Por encima de dicha barrera, el canal avanza hacia el centro de la proteína hasta que alcanza la Tyr385, que comunica ambos centros activos y es el residuo catalítico crítico que inicia la ruta biosintética de las COXs ya que dona un átomo de hidrógeno al grupo hemo durante la activación de la enzima, generando un radical tirosil que posteriormente abstrae el átomo de hidrógeno pro-*S* del C₁₃ del AA. Enfrente de este residuo, se encuentra la Ser 530 que es el objetivo de la acetilación por parte de la aspirina y cuya modificación reduce la formación de PGG₂ a un producto muy minoritario^{13,115}.

Estos dos residuos definen el recodo del canal que conduce a un recoveco hidrofóbico, el cual posee un túnel estrecho que proporciona una vía de escape para las moléculas de agua que deben abandonar la cavidad tras la unión de un ligando. Sin embargo, este túnel es demasiado estrecho como para permitir la salida de productos de reacción o inhibidores. Cabe destacar que este canal en forma de L invertida está definido por las hélices 6 y 17 en su región cercana a la entrada, mientras que el recoveco hidrofóbico vendría definido por las hélices 2 y 8. A parte de todo lo comentado, el centro activo COX contiene una pequeña cavidad adicional, denominada *sidepocket*, que se encuentra cerca de la entrada de dicho centro activo y está conectada con el canal principal por la parte opuesta a donde éste tiene el recoveco hidrofóbico. Para concluir, queda destacar las diferencias que presentan los centros activos COX de ambas isoformas entre sí. Antes de nada, es importante notar que dichos centros activos son altamente homólogos, presentan una identidad cercana al 85%, es decir, éstos presentan una identidad mayor que la que presentan las isoformas consideradas en su totalidad para un organismo dado. Aunque este alto grado de identidad limita las posibles interacciones que podrían dar lugar a selectividad entre isoformas, existen dos sustituciones que son clave en este aspecto: 1) sustitución de Val523 en COX-2 a Ile523 en COX-1; 2) sustitución de Arg513 en COX-2 a His513 en COX-1. En relación con la primera sustitución, que es la más determinante de las dos, la presencia de Val en COX-2, un residuo menos voluminoso que Ile, contribuye a que el centro activo COX de la isoforma COX-2 sea aproximadamente un 25% mayor que el de COX-1. Este centro activo más espacioso, permite a COX-2 oxigenar eficientemente sustratos que o no son oxigenados o son oxigenados pobremente por COX-1¹¹⁶⁻¹¹⁹. De hecho, COX-2 conserva algo de su actividad tras la acetilación por parte de la aspirina, mientras que la COX-1 queda totalmente inactivada. Además, esta primera sustitución provoca que el *sidepocket* de COX-2 sea más accesible que el de COX-1, cosa que ha sido aprovechada para el desarrollo de algunos tipos de COXIBs^{102,120-124}. En relación con la segunda sustitución, su efecto principal sería capacitar a COX-2 a utilizar derivados del AA que contienen grupos amida o éster como sustrato, además de inducirle una mayor selectividad hacia los heterociclos diarílicos¹²².

1.3.2 Unión de sustratos al centro activo COX

Aunque en la presente tesis no se va a tratar el mecanismo catalítico de las COXs, es importante tener presente que para la biosíntesis de PGs o de TXA₂ es necesario en primer lugar la conversión de AA a PGG₂, que tendría lugar en el centro activo COX, y

en segundo lugar es necesario la conversión de PGG₂ a PGH₂, que tendría lugar en el centro activo POX. Debido a que el primer intermedio que conduciría a la formación de los mediadores lipídicos de señalización que se acaban de enunciar se forma mediante la dioxigenación regioespecífica y estereoespecífica del AA en el centro activo COX, es fundamental entender cómo se unen los diferentes sustratos en el centro activo COX haciendo especial hincapié en el caso particular del AA.

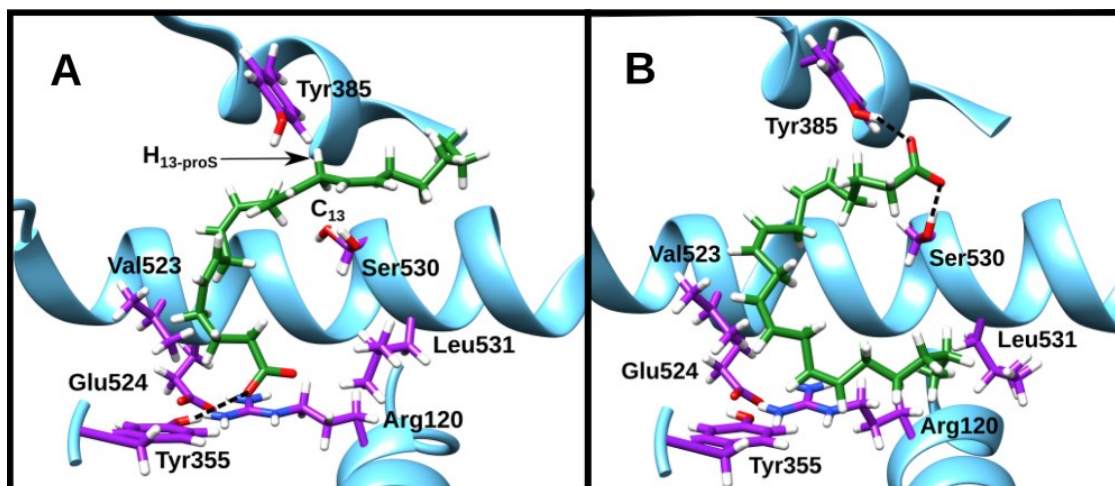


Figura 12. Representación de la conformación productiva (panel A) y no productiva (panel B) del AA en el centro activo COX de la COX-2 (*PDB code* 3HS5). El AA está descrito en verde oscuro y los puentes de hidrógeno que forma están indicados con líneas discontinuas. En la conformación productiva, aparece la Ser530 con las dos posibles conformaciones que puede adoptar. Tanto los residuos representados como el AA están representados en *stick*.

El modo de unión más común para la mayoría de ácidos grasos en dicho centro activo es con el grupo carboxilato interaccionando con Arg120 y/o Tyr355, mientras que la cadena de átomos de carbono se extiende hacia el interior de la proteína rodeando Ser530 y llenando el recoveco hidrofóbico. Las interacciones entre los ácidos grasos y el centro activo COX son de naturaleza hidrofóbica con la excepción de aquellas que involucran al grupo carboxilato^{102,120,121,125,126}. Cabe destacar que, aunque el centro activo COX acomoda una amplia gama de ácidos grasos, los cuales varían en longitud de cadena y grado de saturación, la conformación que presentan éstos en el interior de dicho centro activo es ampliamente conservada. Sin embargo, COX-2 y COX-1 presentan diferencias interesantes en relación con la conformación de éstos en el interior de sus respectivos centros activos COX. La más notable sería que algunos sustratos, entre los cuales se encuentra el AA, pueden presentar dos conformaciones totalmente distintas en el centro activo COX de COX-2, la conformación productiva y la no productiva, mientras que solamente una en el de COX-1, la cual es homóloga a la conformación productiva de COX-2 (Figura 12). A continuación, se va a ilustrar en qué consisten las conformaciones que acabamos de presentar centrándonos en el caso particular del AA en el centro activo COX de la COX-2 donde se van a ir enumerando las diferencias existentes entre COX-2 y COX-1. Cabe destacar que los rasgos característicos de las conformaciones del AA que

se van a exponer se pueden aplicar en gran medida a los demás sustratos de las COXs, aunque para un análisis conformacional exhaustivo de éstos es preferible consultar bibliografía especializada en el sustrato particular a estudiar.

Respecto a la conformación productiva del AA en COX-2, cuya estructura cristalográfica no fue publicada hasta 2010 (*PDB code* 3HS5)¹²⁷, éste exhibe una conformación en forma de L donde su grupo carboxilato se encuentra cercano a la entrada del centro activo, concretamente cerca de las cadenas laterales de Arg120 y Tyr355, mientras que su extremo omega está recubierto por los residuos fenilalanina (Phe) 205, Phe209, Val228, Val344, Phe381 y Leu534 ocupando el recoveco hidrofóbico. Por otra parte, sus átomos de carbono centrales rodean la cadena lateral de Ser530 colocando adecuadamente el C₁₃ por debajo del átomo de oxígeno fenólico de Tyr385 para la abstracción de su átomo de hidrógeno pro-S. Este tipo de conformaciones se consideran como productivas debido a que el AA presenta un adecuado alineamiento posicional y estereoquímico necesario para iniciar la reacción ciclooxygenasa. La principal diferencia entre las interacciones que establece el AA con COX-2 y con COX-1 es que en el caso de la COX-2 el grupo carboxilato únicamente forma un puente de hidrógeno con Tyr355, mientras que en el caso de la COX-1, este grupo forma un puente salino con Arg120 y un puente de hidrógeno con Tyr355. Cabe destacar que la interacción entre Arg120 y el grupo carboxilato de los ácidos grasos es necesaria para la unión de sustratos en COX-1¹²⁸. Sin embargo, Arg120 en COX-2 interacciona con Glu524 mediante puentes salinos cerrando y estabilizando la barrera de la entrada al centro activo COX. Por otro lado, para compensar la estabilización que aporta la formación del puente salino con Arg120, el AA en COX-2 presenta un mayor número de interacciones hidrofóbicas entre su extremo omega y la proteína que en COX-1, lo cual resulta en un total de 53 interacciones hidrofóbicas en COX-2, mientras que en COX-1 el total es de 45. A pesar de esta diferencia, una menor interacción polar del AA con la enzima en COX-2 junto con su centro activo COX mayor conducen a una mayor flexibilidad del AA cuando éste se encuentra en el centro activo de dicha isoforma^{127,129}. Al comparar la disposición espacial de las cadenas laterales de los residuos que conforman el centro activo COX de ambas isoformas se puede apreciar que ésta varía poco, donde Arg120, Ser530 y Leu531 serían excepciones. En primer lugar, como se ha comentado anteriormente, la ausencia de interacción entre la cadena lateral de Arg120 y el grupo carboxilato del sustrato en COX-2 resulta en la formación de puentes salinos entre los grupos NH₂ del catión guanidinio de Arg120 y los átomos de oxígeno del grupo carboxilato de Glu524, mientras que en COX-1, la cadena lateral de dicha arginina interacciona de manera bifurcada mediante puentes salinos tanto con Glu524, concretamente con sólo uno de sus átomos de oxígeno de su grupo carboxilato, como con el grupo carboxilato del sustrato¹³⁰⁻¹³². Es importante notar que para poder establecer dichas interacciones en ambas isoformas, la cadena lateral de Arg120 tiene que cambiar de conformación ya que la disposición espacial de los grupos funcionales con los cuales interacciona en cada isoforma cambia sustancialmente. En segundo lugar, Ser530 exhibe dos conformaciones en COX-2 mientras que únicamente una en COX-1. Esta mayor flexibilidad en la cadena lateral de Ser530 puede facilitar el acceso del extremo omega del AA en el recoveco hidrofóbico del centro activo COX¹²⁷ e incluso contribuir al alineamiento adecuado de C₁₃ por debajo de Tyr385¹³³. En tercer lugar, en ambas isoformas se puede observar que la cadena lateral de Leu531 interacciona

de manera hidrofóbica con la cadena lateral de Arg120 estabilizándola cuando el sustrato se ha unido al centro activo COX. Sin embargo, mutaciones de este residuo han demostrado que esta interacción tiene un peso mayor a la hora de determinar la afinidad de unión del sustrato en COX-1 que en COX-2¹³⁴. Además, también se ha podido observar que la cadena lateral de Leu531 exhibe una mayor libertad de movimiento en COX-2, sugiriendo que su interacción con Arg120 es menos relevante en dicha isoforma. Esta mayor libertad de movimiento es importante desde un punto de vista de aumentar el espacio disponible para la unión del sustrato en el centro activo COX, cosa que en parte explicaría la capacidad de COX-2 de acoger un espectro más amplio de sustratos que COX-1^{118,135,136}. Para concluir con la conformación productiva, en COX-2 se establece una red de puentes de hidrógeno donde participan moléculas de agua entre His90, Tyr355, Arg513 y Glu524 aportando una estabilidad adicional a la barrera de la entrada del centro activo COX. Sin embargo, esta red no puede establecerse en COX-1 porque el residuo que ocupa la posición 513 en esta isoforma es una His en lugar de una Arg. Cabe destacar que éste es uno de los tres residuos del centro activo COX, más concretamente del *sidepocket* de éste, que difieren entre ambas isoformas, los otros dos son: 1) el residuo que ocupa la posición 523 (ya comentado en sección 1.3.1), que en COX-2 es una Val mientras que en COX-1 es una Ile; 2) el residuo que ocupa la posición 434, que en COX-2 es una Val mientras que en COX-1 es una Ile.

Respecto a la conformación no productiva del AA en COX-2, cuya estructura cristalográfica fue publicada por primera vez en 2000 (*PDB code* 1CVU)¹³⁷, éste estabiliza su grupo carboxilato mediante dos puentes de hidrógeno, uno con la cadena lateral de Tyr385 y el otro con la cadena lateral de Ser530, mientras que la cadena de átomos de carbono se extiende hacia la barrera de la puerta de manera que el extremo omega del AA ocupa el espacio que hay por encima de Arg120 y está próximo a la cadena lateral de Leu531, la cual ha tenido que experimentar una rotación hacia fuera del centro activo COX para poder alojar dicho extremo omega. Es importante notar que esta rotación únicamente es observada en COX-2 y que proporciona espacio adicional en el centro activo COX permitiendo tanto la conformación no productiva de algunos sustratos como la unión de sustratos más voluminosos. Esta diferencia entre isoformas explica por qué ningún ácido graso exhibe una conformación no productiva en COX-1 y la selectividad de dicha isoforma hacia sustratos menos voluminosos.

1.3.3 Metabolitos de las ciclooxigenasas

Aunque en la presente tesis no se ha estudiado la actividad catalítica de las COXs, se van a presentar los metabolitos principales que derivan de la ruta metabólica de dichas enzimas partiendo del AA como sustrato inicial con el objetivo de remarcar las funciones fisiológicas en las cuales las COXs están involucradas. La familia de productos ciclooxigenados que producen las COXs mediante la conversión de ácidos grasos omega-6 y omega-3 se conoce como prostanoïdes, cuyo nombre deriva del hecho de que éstos fueron detectados por primera vez en el fluido seminal humano, cosa que condujo a pensar erróneamente que eran productos de la glándula prostática^{138,139}.

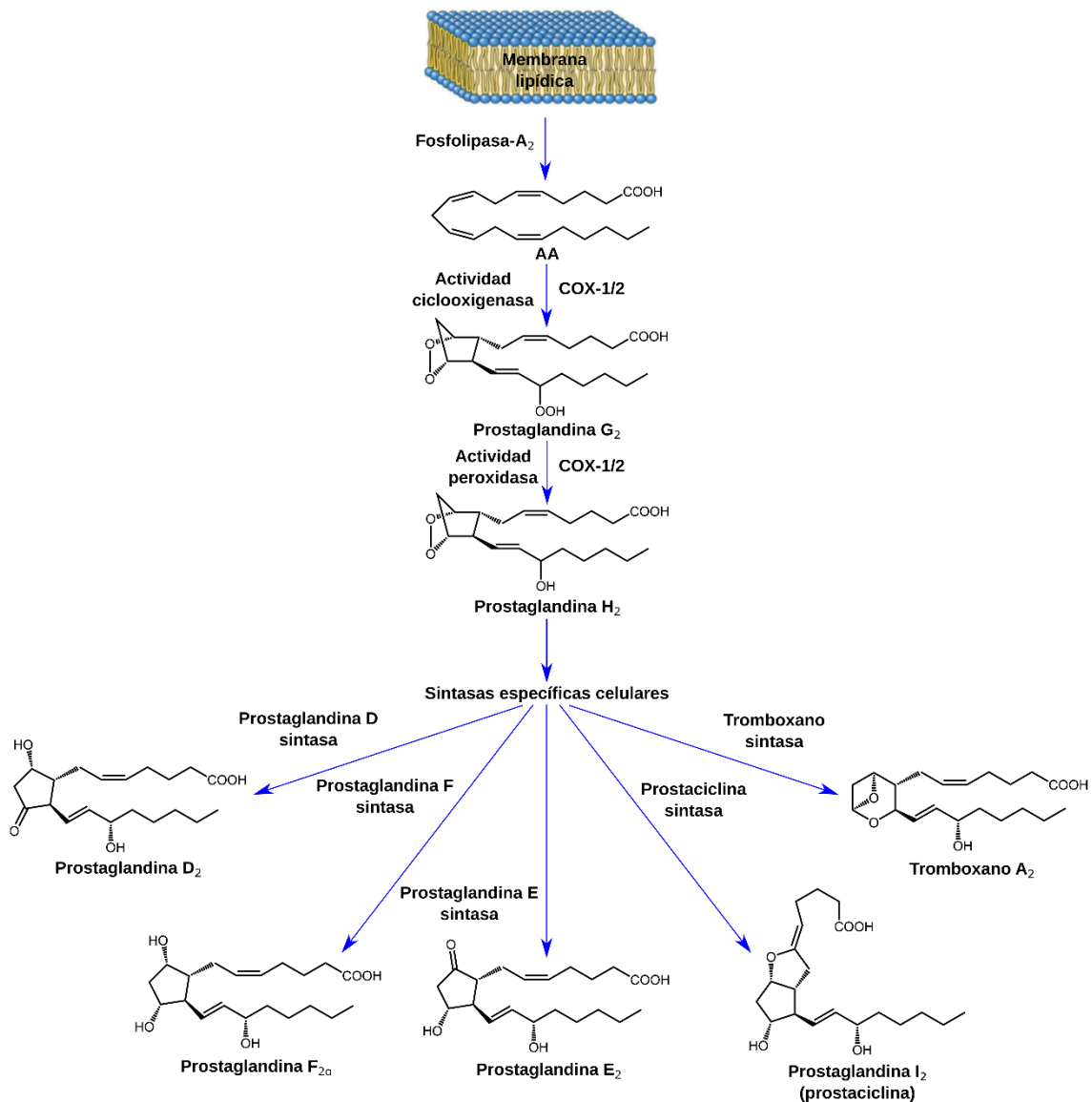


Figura 13. Ruta biosintética de los prostanoideos principales. La dioxigenación y ciclación del AA en el centro activo COX de COX-1 o COX-2 produce PGG₂. La reducción del grupo 15-hidroperoxilo de PGG₂ en el centro activo POX de COX-1 o COX-2 produce PGH₂, la cual sirve como sustrato para cinco sintasas diferentes, produciendo PGs (prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) y prostaglandina E₂ (PGE₂)), prostaciclina (PGI₂) y tromboxano A₂ (TXA₂). Cabe destacar que ningún tipo celular contiene todas las sintasas específicas indicadas en la propia figura y que PGH₂ es químicamente inestable en condiciones fisiológicas y en ausencia de dichas sintasas esta prostaglandina es hidrolizada a una mezcla de PGD₂ y PGE₂.

De manera similar a las LOXs, la ruta metabólica de las COXs se inicia mediante la hidrólisis de lípidos que conforman membranas lipídicas por parte de la fosfolipasa-A₂, liberando ácidos grasos poliinsaturados, entre los cuales se encuentra el AA que es el sustrato principal de las COXs. Una vez liberado dicho ácido, el centro activo COX cataliza la dioxigenación del AA formando PGG₂. Posteriormente, este metabolito se difunde hacia el centro activo POX donde su grupo hidroperóxido es reducido a un alcohol

generando PGH_2 , el cual sirve como sustrato a otras sintasas que lo transforman en un conjunto de mediadores lipídicos, más concretamente los prostanoideos, cuya señal es transducida mediante la interacción con uno o más receptores acoplados a proteínas G específicos (GPCRs) (Figura 13)^{102,105,120,140,141}. Cabe destacar que el prostanoides final obtenido viene determinado por la sintasa específica que convierte PGH_2 y no por la isoforma de las COXs que genera dicha prostaglandina intermedia, es decir, el prostanoides final obtenido viene determinado por el tipo celular donde se produce. Los prostanoideos, que aparte de estar involucrados en la respuesta inflamatoria¹⁴², regulan diversas funciones en el sistema cardiovascular, el sistema gastrointestinal, el sistema urogenital y el sistema nervioso, además de tener un papel destacado en la inmunidad¹⁵, se subdividen en tres subclases: 1) prostaglandinas que son mediadores de los procesos inflamatorios¹⁴³; 2) prostaciclina, en particular PGI_2 , que ejercen un efecto vaso dilatador mediante la inhibición de la agregación plaquetaria¹⁴⁴ y protegen la mucosa gástrica; 3) tromboxanos, en particular TXA_2 , que son vasoconstrictores y facilitan la agregación plaquetaria¹⁴⁵.

1.3.4 Función biológica y patologías asociadas

Como se ha introducido anteriormente, las COXs catalizan la formación de PGs las cuales tiene un papel fundamental en numerosos procesos biológicos y patológicos, donde entre todos ellos, destacaríamos la inflamación puesto que ha motivado el estudio de dichas enzimas en la presente tesis.

Por un lado, COX-2 es una enzima fundamentalmente inducible, expresada en zonas donde existe inflamación, infección y/o cáncer¹⁴⁶, la cual genera prostanoideos que tienen un papel destacado desarrollando dichas patologías. Sin embargo, esta isoforma también se expresa de manera constitutiva en áreas que no están asociadas con las patologías anteriores tales como cerebro, timo y riñón¹⁴⁷, siendo relevante en diversas funciones homeostáticas¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Es importante notar que ambas isoformas están implicadas en los procesos de reproducción, aunque COX-2 destaca por encima de la otra isoforma, ya que en hembras, su expresión influye en la correcta ovulación, fertilización e implantación embrionaria mientras que su actividad es responsable de la angiogénesis y del inicio de la formación de la placenta¹⁵¹. En relación con procesos patológicos, COX-2, aparte de participar en la inflamación, tanto en su fase inicial como en su fase de resolución¹⁵² (cuando está acetilada), también está involucrada en la oncogénesis, ya que se ha detectado su sobreexpresión en tejidos tumorales^{152,153}. De hecho, un aumento en la expresión de COX-2 reprograma células cancerosas benignas a malignas, altera el crecimiento y proliferación celular, favorece la metástasis y permite a las células cancerosas evadir la apoptosis y la respuesta inmunitaria^{154,155}. Además, cambios en su expresión se relacionan con el Alzheimer¹⁵⁶ y el glaucoma¹⁵⁷.

Por otro lado, COX-1 se encuentra en la mayoría de tipos celulares y es responsable tanto del correcto funcionamiento de los órganos corporales como del mantenimiento de la homeostasis. Dicha enzima, ejerce un efecto citoprotector sobre las membranas mucosas, regula el flujo sanguíneo renal, promueve la agregación plaquetaria, relaja el músculo liso vascular y participa tanto en procesos sensoriales como en el control del sistema nervioso autónomo¹³⁹. Además, ambas isoformas contribuyen al desarrollo de las células T¹⁵². En

relación con procesos patológicos, se ha observado su sobreexpresión en ateromatosis y en artritis reumatoide¹⁵⁸.

1.3.5 NSAIDs

El uso de inhibidores de COXs para tratar dolor e inflamación se remonta a las civilizaciones antiguas tales como el antiguo Egipto o la antigua Grecia, cuyos registros indican que plantas ricas en salicilatos se emplearon como medicinas. Cabe destacar la prescripción de corteza de sauce para el dolor articular por Dioscórides, un médico griego de la armada romana. Sin embargo, el compuesto activo de dicha corteza no se conoció hasta el siglo XVIII, cuando se identificó la salicina, un éster natural del alcohol salicílico¹²⁴. Posteriormente, en 1860 Kolbe y Lautemann desarrollaron un método altamente eficiente para la síntesis de ácido salicílico a partir de fenol, cosa que permitió su comercialización como medicamento antiséptico y antipirético al público general, aunque la mayoría de pacientes se quejaban por su exceso de amargura. Este inconveniente, condujo a Felix Hoffman, de la compañía Bayer, a sintetizar y fomentar el uso de un derivado del ácido salicílico más agradable al gusto en 1897, el ácido acetilsalicílico, más conocido como aspirina, el cual fue comercializado por Bayer en 1899 y puede ser considerado como el primer NSAID propiamente dicho¹⁵⁹. Aunque se descubrieron otros NSAIDs como fenilbutazona, indometacina e ibuprofeno, no fue hasta 1971 cuando se comprendió el mecanismo de acción primario de los NSAIDs, el cual consiste en la inhibición de la biosíntesis de PGs¹⁶⁰⁻¹⁶³. El posterior esfuerzo para producir mejores NSAIDs y entender su biología farmacológica y química junto con el descubrimiento de la isoforma COX-2¹⁰²⁻¹⁰⁴ y de su sobreexpresión durante la inflamación propició la creación de COXIBs, NSAIDs selectivos de la COX-2, que deberían proporcionar actividad antiinflamatoria con menores efectos secundarios que los producidos por los NSAIDs que no son selectivos respecto ninguna de las dos isoformas. Dicha hipótesis se basa en la asunción que las PGs que derivan de la COX-1 están involucradas en funciones homeostáticas, particularmente en el tracto gastrointestinal. Hoy en día es conocido que la toxicidad gastrointestinal asociada a los NSAIDs es provocada por la inhibición de la COX-1^{164,165}. Para concluir, es importante notar que aunque todos los NSAIDs presentan efectos secundarios adversos, tanto los no selectivos como los selectivos hacia una isoforma, éstos son fármacos muy populares globalmente para tratar la inflamación. Además, también son utilizados para tratar la artritis y para prevenir el cáncer. Por todo esto, la administración de NSAIDs que sean solamente activos en la zona donde se encuentre la patología a tratar constituiría un gran avance médico. Como se ha comentado en la perspectiva general de la presente tesis, estos NSAIDs localmente activos podrían conseguirse mediante la incorporación de un fotointerruptor, azobenceno o similar, en el NSAID original.

1.3.5.1 Clasificación

Los NSAIDs pueden ser clasificados en base a su selectividad, su cinética de inhibición o su estructura química¹²⁴.

Respecto a la clasificación en base a su selectividad, es importante notar que la mayoría de NSAIDs inhiben ambas isoformas de las COXs, aunque éstos pueden exhibir diferentes grados de selectividad hacia COX-1 o COX-2. Por lo tanto, los NSAIDs pueden ser clasificados como no selectivos, selectivos en relación con la COX-1 o selectivos en relación con la COX-2 en base a dicho criterio.

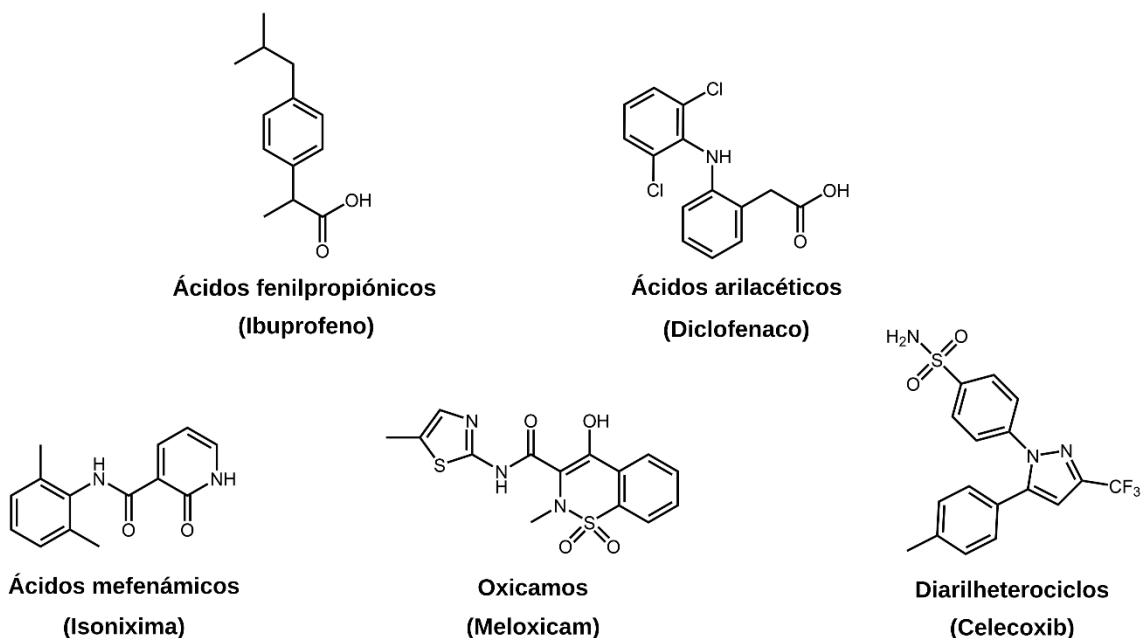


Figura 14. Representación de las principales categorías estructurales de los NSAIDs mediante la ejemplificación con un integrante de cada una. Para cada categoría representada, de arriba hacia abajo: 1) estructura química del integrante escogido; 2) nombre de la categoría estructural; 3) nombre del integrante escogido, el cual se encuentra entre paréntesis.

Respecto a la clasificación en base a su cinética de inhibición, la interacción de los NSAIDs con las COXs puede ser clasificada desde un punto de vista cinético en base a su afinidad de unión y a su dependencia con el tiempo¹²². En un extremo se encuentra la aspirina, que inhibe de manera irreversible e independiente del tiempo, ya que modifica covalentemente la Ser530 en el centro activo COX. En el otro extremo se encuentra el ibuprofeno, que inhibe de manera rápida y reversible la oxigenación del AA, aunque su potencia de inhibición es moderada. Entre estos dos se encuentran los inhibidores cuya inhibición es no covalente y depende del tiempo, tales como indometacina y flurbiprofeno. La mayoría de éstos exhiben una potente inhibición que es reversible muy lentamente. Respecto a la clasificación en base a su estructura química (Figura 14), la gran mayoría de NSAIDs puede clasificarse en una de estas cinco clases químicas: 1) ácidos fenilpropiónicos; 2) ácidos arilacéticos; 3) ácidos mefenámicos; 4) oxicamos; 5) diarilheterociclos. La clasificación en base a dicho criterio es útil, ya que los compuestos de una misma categoría estructural generalmente interaccionan con el centro activo COX con un modo de unión similar. Sin embargo, esta clasificación estructural no predice necesariamente el comportamiento cinético ni la selectividad hacia isoformas o sustratos.

1.3.5.2 Mecanismo de acción y modo de unión de los NSAIDs

Es bien conocido que los efectos farmacológicos principales de los NSAIDs surgen de la inhibición de las COXs. Esta inhibición la ejercen mediante su unión al centro activo COX, ya sea de manera directa, impidiendo la unión de cualquier sustrato en dicho centro activo, o de manera indirecta, induciendo un cambio conformacional en el monómero vacío que impide la unión de un sustrato en éste (efecto alostérico). En este último caso, es necesario que la COX se encuentre en forma de homodímero aunque los monómeros por sí solos son totalmente funcionales.

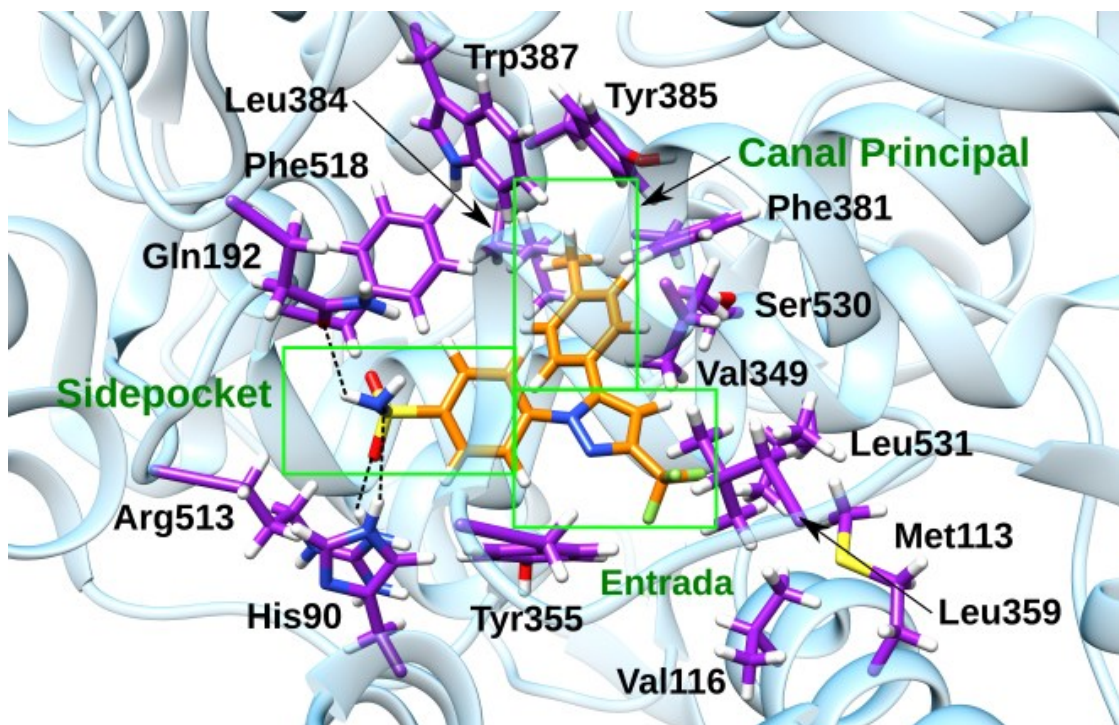


Figura 15. Representación del modo de unión de celecoxib, indicado en naranja, en el centro activo COX (*PDB code 3HS5*)¹²⁷. En lila están indicados los residuos que rodean el celecoxib mientras que en verde están indicadas las diferentes zonas del centro activo COX que éste ocupa. Al lado de dichas zonas se ha indicado su nombre en verde oscuro. Los puentes de hidrógeno que establece el celecoxib están representados por líneas negras discontinuas. Tanto el celecoxib como los residuos que lo rodean están representados en *stick*.

Con la amplia gama de estructuras químicas que presentan los NSAIDs, no es sorprendente que éstos exhiban muchos modos de unión diferentes en el centro activo COX, aunque casi todos ellos establecen interacciones con la entrada y el canal principal del centro activo COX. Es importante subrayar que los oxicamos crean una cavidad adicional, constituida por metionina (Met) 113, Val116, Leu117, Ile345, Val349, Leu359, Leu531, Leu534 y Met535, en ambas isoformas forzando la rotación de la cadena lateral de Leu531 hacia fuera del centro activo COX. Es interesante notar que esta rotación se observa en COX-2 en la unión de ácidos grasos voluminosos, mientras que en COX-1, no se observa en la unión de dichos sustratos. Por otra parte, una característica común de

muchos inhibidores es la presencia de un grupo carboxilato. Como sucedía con el AA, este grupo funcional puede interactuar con los residuos que conforman la barrera de la entrada al centro activo COX (Arg120, Tyr355 y Glu524), éste sería el caso para la mayoría de inhibidores, o con Tyr385 y Ser530, de manera similar al AA en su conformación no productiva. Como pasaba con la unión de sustratos, la formación de interacciones iónicas en la barrera de la entrada es menos importante para la potencia inhibidora para COX-2 que para COX-1, cosa que puede ser explotada para diseñar COXIBs mediante la conversión del grupo carboxilato de algunos NSAIDs no selectivos al correspondiente grupo éster o amida. Los diarilheterociclos, los cuales despiertan un especial interés en la presente tesis debido a que presentan un esqueleto de tres anillos que es ideal para la introducción de un grupo azo y a que un gran número de ellos es selectivo respecto a la COX-2, ocupan el *sidepocket* del centro activo COX, cosa que determina en gran medida su selectividad ya que dicha cavidad es mucho más accesible en COX-2 que en COX-1.

Debido al interés que se acaba de comentar, se va a explicar el modo de unión de los NSAIDs diarilheterociclos en detalle centrándonos en el caso particular del celecoxib (Figura 15), que es un NSAID de esta familia que es selectivo respecto de la COX-2 y que todavía se comercializa a pesar de sus efectos secundarios cardiovasculares severos. A grandes rasgos, dichos NSAIDs ocupan la entrada, el *sidepocket* y el canal principal del centro activo COX. Respecto a la entrada, ésta es ocupada por el heterociclo de estos NSAIDs. En el caso particular del celecoxib, éste ocupa dicha entrada con su anillo pirazol y con el sustituyente trifluorometil que cuelga de este anillo, el cual está rodeado por los residuos Met113, Val116, Val349, Tyr355, Leu359 y Leu531. En relación con el *sidepocket*, éste es ocupado por uno de los dos grupos arilo que contiene este tipo de compuestos, el cual acostumbra a tener un sustituyente sulfonamida o metilsulfona que le proporciona selectividad respecto a la COX-2. En el caso particular del celecoxib, éste ocupa el *sidepocket* con su grupo arilsulfonamida donde dicha sulfonamida establece puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de His90, glutamina (Gln) 192 y Arg513. Cabe destacar que el último puente de hidrógeno mencionado no puede ser formado en COX-1, ya que el residuo que ocupa la posición 513 en esta isoforma es una His, cuya cadena lateral es sustancialmente más corta que la de una Arg. La pérdida de este puente de hidrógeno junto con una menor accesibilidad al *sidepocket* de COX-1 son los principales responsables de la selectividad de los NSAIDs diarilheterociclos hacia la COX-2¹⁶⁶. En último lugar, cabría mencionar que el canal principal lo ocupa el grupo arilo restante, el cual se encuentra rodeado por los residuos Phe381, Leu384, Tyr385, Trp387, Phe518 y Ser530. En el caso particular del celecoxib, este grupo arilo está sustituido por un grupo metilo en posición para, cosa que acentúa las interacciones hidrofóbicas entre este grupo arilo y los residuos que lo rodean.

1.3.5.3 Aplicaciones y efectos secundarios de los NSAIDs

Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos se encuentran entre los fármacos más prescritos en todo el mundo, los cuales se utilizan principalmente para tratar dolor, fiebre e inflamación¹⁶⁷⁻¹⁷⁰, es decir, su diana farmacológica es la COX-2 inducida por estas patologías y dichos fármacos bloquean la conversión del AA a PGs proinflamatorias por

esta isoforma. Además, los NSAIDs también se emplean para tratar osteoartritis, artritis reumatoide y trastornos musculoesqueléticos. Es importante subrayar que estos fármacos, especialmente los COXIBs, tienen un gran potencial en la prevención y el tratamiento del cáncer, ya que su uso es beneficioso para la profilaxis de tumores (de hecho, ensayos clínicos han notificado que el celecoxib previene alrededor del 50% de cánceres de colon en individuos susceptibles¹⁷¹), inhibe la progresión tumoral y mejora los resultados del tratamiento en pacientes con tumores, ya sea aplicándolos en solitario o en combinación con quimioterapia o radioterapia^{14,172-176}. Por otra parte, la aspirina, que es el NSAID más antiguo y ampliamente estudiado, sería un caso singular debido a que su diana farmacológica es la COX-1 presente en las plaquetas y a su utilización en dosis bajas en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Dicha singularidad proviene del hecho de que la aspirina inhibe aproximadamente 116 veces más la COX-1 que la COX-2¹⁸⁰, cosa que tiene un especial impacto en las plaquetas, ya que acetila e inhibe de manera irreversible la COX-1 presente en éstas durante todo su tiempo de vida¹⁶⁸, causando una disminución en la producción de tromboxanos.

En general, los NSAIDs tradicionales inhiben tanto COX-1 como COX-2 de manera no selectiva. Como ya se ha comentado anteriormente (ver sección 1.2.4), la COX-1 es protectora de las membranas mucosas mediante su producción de prostaciclina y su inhibición en el trato gastrointestinal es la responsable de los efectos secundarios comunes de los NSAIDs tales como desarrollo de úlceras gástricas y sangrado gastrointestinal. Para evitar estas complicaciones, se desarrollaron y aprobaron para el uso clínico los COXIBs, los cuales mostraron una gran eficacia contra la inflamación y una reducción de las complicaciones gástricas. Sin embargo, ensayos clínicos de una duración más larga, concretamente SCOT¹⁸¹ (*Standard Care Versus Celecoxib Outcome Trial*) y PRECISION¹⁸² (*Prospective Randomized Evaluation of Celecoxib Integrated Safety vs Ibuprofen or Naproxen*), mostraron que los COXIBs aumentan el riesgo de desarrollar patologías cardiovasculares y renales, donde las primeras son las que generan más preocupación debido a su mayor gravedad ya que entre estas patologías se encuentran el infarto de miocardio y el derrame cerebral. Dichos efectos secundarios cardiovasculares han evitado el desarrollo de nuevos COXIBs y han provocado la retirada de algunos de ellos como el rofecoxib. Además, estos efectos secundarios han conducido a una regulación más estricta de los COXIBs, han ocasionado una disminución en su prescripción en favor de fármacos que son más tóxicos para el intestino y han provocado su no utilización en las terapias contra el cáncer^{15,183,184}. La explicación del aumento de problemas cardiovasculares consiste en que las prostaciclina producidas por la COX-2 expresada de manera constitutiva en el riñón o en el recubrimiento endotelial de los vasos sanguíneos previenen la agregación plaquetaria y la vasoconstricción en el sistema vascular compensando el efecto opuesto de los tromboxanos producidos por la COX-1 en las plaquetas. La inhibición selectiva de la COX-2 sin la correspondiente inhibición de la COX-1 destruye el equilibrio agregación/antiagregación de las plaquetas aumentando el riesgo cardiovascular.

Una solución para la inflamación y algunos procesos cancerosos sería disponer de NSAIDs que inhibieran la COX-2 inducida por la inflamación y/o el cáncer, sin afectar a la COX-1 y la COX-2 constitutivas, cosa que supondría un hito en farmacología y medicina. Compuestos con esta actividad biológica podrían ser conseguidos mediante la

incorporación de un grupo azo en los NSAIDs ya existentes, estos azo compuestos actuarían como fotointerruptores precursores de los NSAIDs únicamente en la zona donde se encuentra la COX-2 inducida mediante la acción de radiación electromagnética, mientras que la COX-1 y la COX-2 constitutivas no serían afectadas.

1.3.5.4 *Photoswitchable NSAIDs*

La farmacoterapia consiste en la praxis terapéutica de administrar una sustancia química exógena, más conocida como fármaco o medicamento, a un paciente para aliviar los síntomas o inducir la curación de una enfermedad. Dicho fármaco puede ser introducido al cuerpo del paciente de diferentes maneras para acabar distribuido por todo su organismo mediante el torrente sanguíneo. Posteriormente, este fármaco llega a los tejidos u órganos que son su diana terapéutica, donde realiza su función una vez que su concentración supera un umbral específico. Finalmente, éste es excretado del organismo al entorno. Cabe destacar que de todas las propiedades que determinan el rendimiento de un fármaco, posiblemente la más crítica es la selectividad¹⁸⁵, ya que regula la preferencia de la molécula a interaccionar o unirse con su diana terapéutica. Si un fármaco es muy selectivo, éste sólo interaccionará o se unirá con su diana terapéutica sin ocasionar efectos secundarios apreciables, mientras que si un fármaco es poco selectivo éste interaccionará o se unirá a dianas terapéuticas parecidas en células sanas perturbando su función y conduciendo a efectos secundarios notables. De hecho, ésta es la principal razón por la que candidatos a fármacos muy prometedores no pueden ser usados, ya que sus efectos secundarios son devastadores cuando son usados a concentraciones que son terapéuticamente activas. Es importante notar que el proceso de excreción final genera un problema adicional, ya que el vertido de fármacos activos farmacológicamente al entorno induce poblaciones de organismos resistentes a éstos, cosa que puede disminuir su eficacia o incluso eliminarla a largo plazo.

Por otra parte, la fotofarmacología es un paradigma reciente en el diseño de fármacos que enfoca de manera totalmente diferente la cuestión de la selectividad^{185,186}. Ésta se basa en un principio terapéutico articulado en dos fases: 1) el fármaco es administrado al paciente en una forma que no tiene actividad farmacológica, cosa que lo hace inocuo; 2) dicho fármaco es activado mediante la acción de radiación electromagnética de longitud de onda adecuada. Debido a que la luz es inocua a longitudes de onda suficientemente grandes y a que puede ser administrada con precisión geométrica y temporal, ya sea a través de la piel, mediante un orificio corporal o mediante el uso de fibra óptica que es introducida a través de una pequeña incisión, la fotofarmacología tiene el potencial necesario para eludir las complicaciones que surgen de una selectividad pobre, especialmente en el caso de enfermedades que afectan zonas del cuerpo muy específicas, tal como el cáncer, ya que el fármaco estaría presente en forma inactiva en todo el organismo con la excepción de las zonas que fueran iluminadas, en las cuales éste se encontraría en su forma activa.

La presente tesis trata un tipo específico de fármacos fotoactivos, aquéllos que se basan en fotointerruptores, es decir, consisten en una molécula farmacológicamente activa la cual ha sido modificada ligeramente para que incorpore un fotointerruptor unido covalentemente. Como se ha comentado anteriormente (ver sección 1.1), un

fotointerruptor es una molécula que experimenta un cambio reversible bajo el efecto de luz de una longitud de onda específica. La mayoría de ellos, experimentan una isomerización *trans(E)-cis(Z)* de un doble enlace que induce grandes cambios de forma y/o volumen. Este hecho se puede usar como la base física para inducir diferentes afinidades en fármacos que los incorporan hacia sus dianas terapéuticas, ya que presentarán una forma activa, que encaje en la diana, y una forma inactiva, la cual no encajará en dicha diana. Cuando la luz cesa, el fotointerruptor puede evolucionar de dos maneras: 1) decae térmicamente a su estado más estable termodinámicamente, el cual ha de ser inactivo farmacológicamente; 2) es desactivado mediante el uso de luz de longitud de onda adecuada. En este último caso, es deseable que las longitudes de onda para las fotoisomerizaciones directa e inversa estén suficientemente separadas para poder controlar completamente ambos procesos, esta propiedad es conocida como *addressability*. Es importante notar que independientemente de cómo evolucione el fotointerruptor, éste proporciona el mecanismo necesario para activar el fármaco exactamente **cuándo** y **dónde** se necesita y, además, lo desactiva cuando el fármaco abandona la región iluminada o cuando dicho fármaco es irradiado con luz de longitud de onda que revierta la isomerización inicial. Cabe destacar que, en ambos casos, se evitan los efectos secundarios y está garantizado que cuando el fármaco es excretado, éste se encuentra en su forma inactiva, de manera que no contribuye a generar poblaciones de organismos resistentes que comprometerían el uso de estos fármacos en el futuro.

Los azobencenos (ABs) son una de las familias de fotointerruptores más ampliamente utilizadas²², cuyo motivo estructural básico consiste en un grupo azo sustituido con dos anillos de benceno (Figura 16). Este tipo de moléculas puede existir en dos formas isoméricas, correspondientes a los isómeros *E* y *Z*, donde el último es menos estable por su mayor impedimento estérico debido a una mayor proximidad entre los anillos de benceno. Los ABs presentan una fuerte banda de absorción en la región ultravioleta del espectro electromagnético y una banda sustancialmente más débil a longitudes de onda mayores, aunque ambas absorciones producen la isomerización fotoquímica *E*→*Z*. Los derivados ABs se pueden utilizar en fotofarmacología siempre y cuando la forma activa terapéuticamente sea el isómero *Z* estéricamente impedido, cosa que permite al fármaco ser inactivo en el organismo en la forma estable *E*. Sólo tras una fotoexcitación el isómero *E* se convertiría al isómero *Z*, terapéuticamente activo, el cual sería el responsable de los efectos secundarios y revertiría térmicamente o bajo la acción de luz de una longitud de onda diferente a la inicial a la forma inactiva. En caso de que la forma activa farmacológicamente del fármaco requiera el isómero *E* por cuestiones geométricas, entonces los fotointerruptores escogidos serían las diazocinas, también conocidas como *bridged azobenzenes* (brABs), las cuales son como los ABs con la particularidad que los anillos de bencenos están unidos mediante una cadena de átomos de carbono (Figura 16). Las brABs muestran una estabilidad opuesta a los ABs, ya que el isómero *Z* es más estable que el isómero *E* debido a la tensión que se produce en la zona que hace de puente entre ambos anillos de benceno. De manera similar a los ABs, los isómeros de las brABs se interconvierten mediante la acción de radiación electromagnética y el isómero *E* decae térmicamente al isómero *Z* más estable. Estos fotointerruptores se han utilizado con éxito, probando que la activación de un fármaco mediante luz es posible, sin embargo, su uso en aplicaciones médicas reales es muy restringido debido a limitaciones en sus propiedades

ópticas, ya que su fotoactivación requiere radiación electromagnética en la región del ultravioleta o del visible de longitud de onda corta (azul), que es donde dichos fotointerruptores muestran una importante absorción. Por otra parte, el tejido vivo es únicamente moderadamente transparente a la luz en la denominada ventana óptica, que corresponde a la ventana del infrarrojo cercano (va de longitudes de onda de 650 nm a 1350 nm). Por lo tanto, el uso de los fotointerruptores sin modificaciones sustanciales conduce a penetraciones muy poco profundas de la luz en los tejidos, normalmente de unos pocos milímetros cuando nos encontramos fuera de dicha ventana óptica, cosa que es insuficiente para aplicaciones médicas. Además, la radiación ultravioleta y del visible de alta energía tiene propiedades citotóxicas y no debe ser irradiada en tejidos vivos.

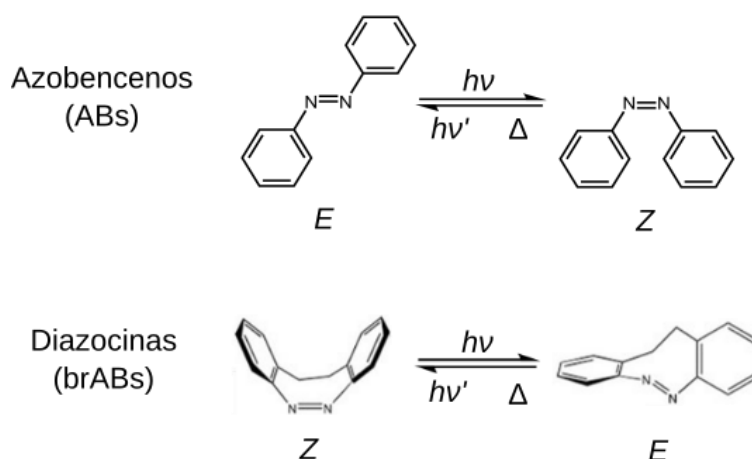


Figura 16. Representación de los fotointerruptores ABs y brABs. Para cada fotointerruptor, se ha indicado a la izquierda del equilibrio su forma más estable termodinámicamente, mientras que a la derecha de éste se encuentra la forma fotoexcitada.

Existen dos principales estrategias para eludir el problema asociado con la región del espectro electromagnético donde se encuentran las longitudes de onda de isomerización de estos fotointerruptores. La primera consistiría en desarrollar fotointerruptores modificados que absorbieran directamente en la ventana óptica. Esta estrategia se ha desarrollado con cierto éxito, ya que se han conseguido ABs y brABs modificados cuya fotoisomerización tiene lugar cuando son irradiados en el límite de la ventana óptica, alrededor de 650 nm, aunque su absorción es débil lo que significa que su fotoconversión es incompleta o lenta, cosa que limita su aplicación¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Es importante notar que la obtención de fotointerruptores que absorbieran dentro de la ventana óptica mediante un fotón facilitaría enormemente su aplicación médica, ya que podrían ser fotoconvertidos mediante láseres de baja energía los cuales fácilmente podrían encontrarse en ambulatorios o incluso en casa. La otra estrategia consistiría en el uso de transiciones multifotónicas, donde las bifotónicas serían las de más fácil aplicación. Aunque esta propiedad de la interacción entre luz y materia había sido postulada en el trabajo pionero de Göppert-Mayer al inicio de la mecánica cuántica¹⁹⁰, los procesos multifotónicos no pudieron ser medidos hasta la aparición de los láseres¹⁹¹. La idea detrás de estas transiciones es bastante simple, en lugar de proporcionar toda la energía para la

fotoisomerización en un solo fotón, cosa que hace que dicho fotón se encuentre fuera de la ventana óptica, esta energía se proporciona mediante la absorción simultánea de dos (transición bifotónica) o más (transición multifotónica) fotones de igual energía. De esta manera, por poner un ejemplo, la energía proporcionada por un fotón de 400 nm, el cual se encuentra en la región del ultravioleta, sería proporcionada por dos fotones de igual energía de 800 nm, los cuales se encuentran en dicha ventana óptica donde la luz es inocua para los tejidos vivos y su penetración alcanza hasta varios centímetros. Es importante notar que hoy en día el instrumental necesario para realizar transiciones multifotónicas está restringido a laboratorios especializados, aunque en estos últimos años esta tecnología ha experimentado mejoras importantes y es de esperar una mayor implantación de ésta en un futuro cercano.

Como se ha ido comentando a lo largo del texto, si fuese posible la incorporación de fotointerruptores a los NSAIDs, supondría un avance médico enorme debido a la gran cantidad de aplicaciones que tienen y al enorme potencial que todavía reside en ellos.

Parte II

Fundamento Teórico

Capítulo 2

Fundamento Teórico

2.1 Preámbulo

Gracias al aumento constante de la potencia computacional se ha podido aplicar la química computacional al estudio de sistemas biológicos, los cuales acostumbran a presentar un gran tamaño y complejidad. De hecho, la química computacional se ha convertido en una herramienta de enorme utilidad a la hora de entender la catálisis enzimática, ya que proporciona entendimiento a nivel molecular de los mecanismos de reacción de las enzimas y permite hacer predicciones. Cabe destacar que dicho entendimiento a nivel molecular de los procesos químicos es la principal ventaja que presentan los métodos computacionales respecto los experimentales, ya que estos últimos no pueden alcanzar tal nivel de detalle. Este capítulo proporciona una perspectiva general de los fundamentos metodológicos empleados a lo largo de la presente tesis. Primero de todo, se tratan los cálculos de *docking*, los cuales permiten obtener los complejos de Michaelis formados entre sustratos y proteínas. Después, se ha abordado la mecánica molecular (MM), nivel de teoría más bajo de la química computacional para calcular energías, la cual se ha implementado en la teoría de dinámicas moleculares (MDs) para describir la evolución temporal de los sistemas estudiados. Posteriormente, se ha tratado la mecánica cuántica (QM), nivel de teoría más alto de la química computacional para calcular energías, que junto con la MM dan lugar a los métodos híbridos *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics* (QM/MM), los cuales son los más idóneos para calcular energías y estudiar procesos reactivos de las enzimas por la relación coste computacional-exactitud que presentan. Finalmente, se han expuesto métodos para calcular barreras de energía de Gibbs para los procesos reactivos estudiados.

2.1.1 Cálculos de *docking*

El objetivo de los cálculos de *docking* es predecir el modo de unión de dos moléculas, donde una acostumbra a ser una molécula de pequeño tamaño que actúa como sustrato o fármaco, la cual recibe el nombre de ligando, mientras que la otra suele ser una molécula grande tal como una proteína, la cual recibe el nombre de receptor (Figura 17). Dichos cálculos consisten en la búsqueda de las conformaciones y orientaciones adecuadas del ligando, las cuales reciben el nombre de poses, dentro del lugar de unión del receptor y se realizan mediante la acción combinada de dos herramientas: 1) el algoritmo de búsqueda, que explora las poses del ligando dentro del receptor; 2) la función de *score* o *fitness*, que evalúa las poses generadas con el objetivo de determinar el mejor modo de unión entre ambas moléculas.

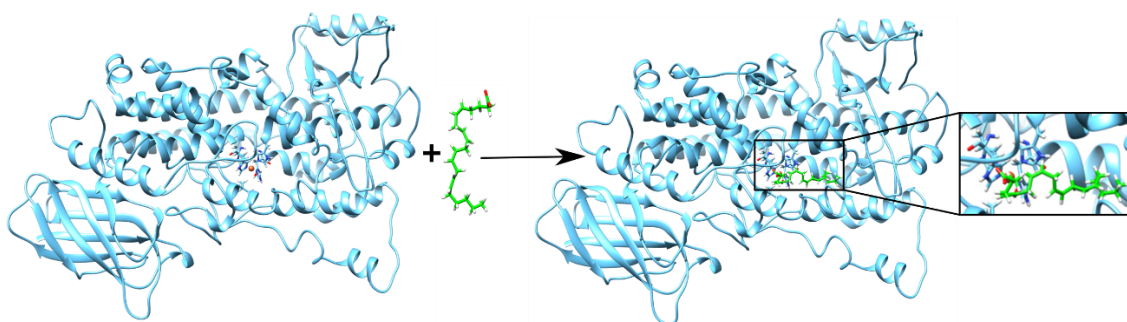


Figura 17. Ilustración de la idea básica de los cálculos de *docking* donde el receptor representado corresponde al monómero B de la 15-LOX (azul claro), mientras que el ligando representado corresponde al AA (verde claro). Se ha indicado la esfera de coordinación del átomo de hierro (indicado en naranja) en el receptor para lograr una mejor orientación espacial. Tanto dicha esfera de coordinación como el AA han sido representados en *stick*.

2.1.1.1 Algoritmos de búsqueda

Los algoritmos de búsqueda son procedimientos para explorar el espacio conformacional del ligando de manera que se encuentren las mejores poses dentro del sitio de unión del receptor. Es importante notar que un buen algoritmo de búsqueda debe considerar tanto las contribuciones entálpicas como las entrópicas, aunque la inclusión de éstas últimas no acostumbra a ser directa en la mayoría de estos algoritmos. Los algoritmos de búsqueda que sólo consideran la flexibilidad del ligando, los cuales son los más comunes, se pueden clasificar en tres tipos¹⁹²: 1) algoritmos sistemáticos, que exploran todos los grados de libertad del ligando (traslacionales, rotacionales y vibracionales) durante la exploración conformacional, generando todas las poses posibles del ligando dentro del sitio de unión del receptor^{193,194}; 2) algoritmos estocásticos, que exploran el espacio conformacional del ligando mediante cambios aleatorios en sus grados de libertad. Existen bastantes tipos de esta clase de algoritmos, donde se podría destacar Monte Carlo o Algoritmo Evolutivo o Genético (que se explicará en detalle ya que ha sido él utilizado a lo largo de la tesis); 3) algoritmos determinísticos, donde la solución final obtenida viene determinada por las

condiciones iniciales del sistema, un ejemplo de este tipo serían los métodos que se basan en simulaciones de MD¹⁹⁵.

El algoritmo evolutivo o genético (GA)^{196,197} es uno de los procedimientos de exploración conformacional más ampliamente utilizado. Además, se incluye en una gran cantidad de *softwares* que realizan cálculos de *docking* como por ejemplo GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*)¹⁹⁸. Este algoritmo mimetiza la evolución biológica mediante la manipulación de una colección de datos estructurales que reciben el nombre de cromosomas, los cuales codifican para los diferentes grados de libertad del ligando y las posibles interacciones receptor-ligando. El GA procede tal y como se detalla a continuación. Primero de todo, se genera una población inicial de cromosomas de manera aleatoria. Posteriormente, el GA aplica dos operadores genéticos (el *crossover*, que combina cromosomas entre sí, y la mutación, que introduce una perturbación aleatoria en un cromosoma) a dicha población resultando en una nueva. Estas dos poblaciones se combinan de manera que los miembros de la población inicial que presenten una menor idoneidad serán sustituidos por los miembros de esta nueva población que presenten una mayor idoneidad generando una única población resultante. Este proceso se repite hasta que se consigue una población final de individuos de idoneidad óptima. Cabe reseñar que esta idoneidad viene predefinida por la función de *score* que se haya seleccionado.

Es importante notar que cuando se ha mencionado exploración conformacional siempre hacía referencia al ligando, es decir, el ligando es considerado flexible mientras que el receptor es considerado rígido. Sin embargo, también se puede incluir flexibilidad en el receptor durante la exploración conformacional. De hecho, este enfoque sería más adecuado ya que es ampliamente aceptado que tras la unión del ligando, el receptor experimenta cambios conformacionales de manera que existe como un colectivo de estados conformacionales en vez de como un único estado conformacional¹⁹⁹. Por otra parte, debido al gran número de grados de libertad que acostumbra a presentar los receptores, incluir la flexibilidad de éstos es todo un reto, por lo que o bien no se considera o bien se considera de manera parcial. Para abordar el problema de la flexibilidad de los receptores, en concreto de las proteínas, se han desarrollado diferentes estrategias que pueden ser clasificadas en cinco clases principales²⁰⁰: 1) *Soft docking*, que lleva a cabo la exploración conformacional habiendo reducido el término repulsivo del potencial de Lennard-Jones, cosa que permite pequeños solapamientos entre los átomos de la proteína y el ligando. La principal ventaja de este enfoque es la velocidad, pero sólo debe ser empleado para considerar movimientos locales; 2) *docking* con flexibilidad en las cadenas laterales, que como el nombre indica, permite el movimiento de las cadenas laterales de los residuos seleccionados dentro del sitio de unión del receptor mediante la exploración de sus grados de libertad torsionales, también conocidos como rotámeros. Para evitar la explosión combinatoria se usan librerías de rotámeros predefinidos que predicen conformaciones discretas de baja energía de las cadenas laterales de los residuos; 3) *docking* con relajación molecular, es decir, la exploración del espacio conformacional se realiza considerando de manera flexible al ligando y de manera rígida al receptor. Sin embargo, los complejos receptor-ligando generados se relajan. Los métodos que se acostumbran a utilizar para dicha relajación son minimización de energía, Monte Carlo o MD; 4) *ensemble docking*, que considera la flexibilidad del receptor mediante la realización de cálculos de *docking* del ligando en un colectivo de conformaciones del receptor; 5) *docking* basado en grados

de libertad colectivos, que considera total flexibilidad del receptor mediante el uso de variables colectivas que representan los modos de movimiento dominantes del receptor, los cuales se han obtenido a partir de la representación multidimensional del movimiento de éste. Su principal desventaja es que los grados de libertad utilizados no son los naturales.

2.1.1.2 Funciones de *score* o *fitness*

Las funciones de *score* evalúan la calidad de las diferentes poses del ligando generadas en un cálculo de *docking*, es decir, cómo de bien está colocado el ligando en el sitio de unión del receptor. Una función de *score* adecuada debe de ser capaz de distinguir entre los verdaderos modos de unión del ligando y los más alternativos. Las funciones de *score* se pueden clasificar en tres categorías: 1) *force field based*; 2) *knowledge based*; 3) empíricas. En primer lugar, las funciones de *score force field based*²⁰¹ se construyen utilizando la MM y tienen la forma de suma de diferentes términos energéticos (ver sección 2.1.2.1). Su principal limitación es que carecen de los efectos de solvatación y entrópicos. En segundo lugar, las funciones de *score knowledge based*²⁰² se construyen a partir de los datos de pares de átomos que interactúan en complejos proteína-ligando con estructura tridimensional disponible, los cuales son ajustados dando lugar a las correspondientes funciones. La principal limitación de este tipo de funciones es su fuerte dependencia con la cantidad de estructuras disponibles para realizar dicha parametrización. En último lugar, las funciones de *score* empíricas hacen una estimación de las energías de unión mediante la suma de términos energéticos que no están correlacionados entre sí, los cuales han sido ajustados mediante regresiones a partir de las energías de unión experimentales de varios complejos proteína-ligando. Su principal ventaja es el pequeño coste computacional que presentan a la hora de valorar las poses obtenidas, mientras que su principal desventaja sería el proceso de parametrización necesario para construir dichos términos energéticos. Un ejemplo de función empírica es la función ChemScore²⁰³, la cual está implementada en muchos programas de *docking*, tal como GOLD, y ha sido utilizada para los cálculos de *docking* de la presente tesis. Esta función asigna un valor a las poses obtenidas mediante la siguiente expresión:

$$\text{ChemScore} = \Delta G_{\text{binding}} + P_{\text{clash}} + c_{\text{int}}P_{\text{int}} + (c_{\text{cov}}P_{\text{cov}} + P_{\text{constr}}) \quad (1)$$

donde $\Delta G_{\text{binding}}$ corresponde a una estimación de la energía de Gibbs de unión, P_{clash} penaliza los contactos próximos entre proteína y ligando, $c_{\text{int}}P_{\text{int}}$ penaliza las conformaciones del ligando con mayor impedimento estérico, mientras que $c_{\text{cov}}P_{\text{cov}}$ y P_{constr} sirven para introducir restricciones a los cálculos de *docking*. Por otra parte, la estimación de la variación de la energía de Gibbs tras la unión de ligando viene dada por la siguiente expresión:

$$\Delta G_{\text{binding}} = \Delta G_0 + \Delta G_{H \text{ bond}} + \Delta G_{\text{metal}} + \Delta G_{\text{lipo}} + \Delta G_{\text{rot}} \quad (2)$$

donde $\Delta G_{H \text{ bond}}$, ΔG_{metal} , ΔG_{lipo} y ΔG_{rot} son para tener en cuenta las variaciones de energía de Gibbs asociadas a la formación de puentes de hidrógeno, a las interacciones

con átomos metálicos, a las interacciones de carácter lipofílico y también a penalizaciones a las rotaciones alrededor de enlaces del ligando que no deberían rotar, respectivamente. Por otra parte, ΔG_0 es un valor que proviene del proceso de parametrización mediante regresiones como se ha comentado antes.

2.1.1.3 Validación de los resultados obtenidos con *docking*

Como se ha intentado hacer notar a lo largo de esta sección, el problema del modo de unión del ligando dentro de un receptor es extremadamente complejo y hasta la fecha no se ha encontrado una manera general de abordarlo. Los cálculos de *docking*, aunque muy útiles, contienen un gran número de aproximaciones, cosa que dificulta la selección de la mejor solución del colectivo de éstas generado. Además, es importante notar que no hay un criterio único a la hora de realizar dicha selección, es decir, esta mejor solución se puede escoger en base al *score* asignado, a la frecuencia de aparición o a algún rasgo estructural que sea relevante desde un punto de vista biológico. Por todo esto, siempre que sea posible, es más recomendable clusterizar el colectivo de soluciones y escoger varias soluciones de los clústeres más poblados que escoger únicamente la mejor opción en base a un criterio determinado.

2.1.2 Mecánica Molecular

Aunque para tratar un sistema cualquiera una descripción completa a nivel QM sería lo más exacto, existen sistemas de tal complejidad y tamaño, los cuales están constituidos desde miles a millones de átomos, que una descripción a dicho nivel es inalcanzable a pesar de la potencia computacional que hay disponible hoy en día. En tales casos, se requiere una descripción más simple de la función energía potencial, la cual ha de implicar un tiempo de cálculo razonable incluso para un gran número de átomos, pero ha de tener una cierta exactitud. La mecánica molecular aplica la mecánica clásica para describir los sistemas moleculares. Es decir, los átomos son tratados como partículas clásicas que vendrían descritas por una serie de parámetros, tales como masa, carga y radio atómico, y la energía del sistema se calcularía como una función de las posiciones de dichas partículas. Por lo tanto, los electrones y los núcleos no se consideran explícitamente, cosa que hace que los eventos químicos, tales como la formación y rotura de enlaces, y cualquier otro que dependa de la distribución electrónica no puedan ser descritos de esta manera. En cambio, la mecánica molecular es adecuada para describir con exactitud los eventos moleculares, como por ejemplo la torsión de un diedro, o para obtener la energía potencial de regiones del sistema que no necesiten demasiada exactitud. Un ejemplo de esto serían los cálculos QM/MM. En último lugar, es importante notar que dicha función energía potencial recibe el nombre de *force field* y que la validez de la mecánica molecular se sustenta en 3 suposiciones: 1) la validez de la aproximación Born-Oppenheimer (ver sección 2.1.4), sin la cual sería imposible escribir la energía potencial en función de las coordenadas de las partículas clásicas; 2) la descripción con un modelo simple de las interacciones dentro del sistema (ver sección 2.1.2.1); 3) la transferibilidad de los parámetros desarrollados y testeados para un sistema a otros similares.

2.1.2.1 Expresión matemática del *force field*

Según la MM, se puede entender el sistema como un conjunto de átomos en el espacio, los cuales están relacionados entre sí mediante potenciales que provienen de la mecánica clásica y la energía potencial del sistema se puede escribir como sigue:

$$E_{MM} = E_{enlazante} + E_{no\ enlazante} \quad (3)$$

donde $E_{enlazante}$ es la energía correspondiente a todas las interacciones enlazantes, es decir, aquellas interacciones que involucran a átomos que no se encuentran a más de tres enlaces de distancia, mientras que $E_{no\ enlazante}$ es la energía correspondiente a todas las interacciones no enlazantes, es decir, aquellas interacciones que involucran átomos que se encuentran en distintas moléculas o átomos que se encuentran en una misma molécula, pero separados por más de tres enlaces. En general, la $E_{enlazante}$ la podemos expresar como la suma de estas contribuciones:

$$E_{enlazante} = E_{bonding} + E_{angle} + E_{dihedral} + E_{improper} + E_{crossterms} \quad (4)$$

donde $E_{bonding}$, E_{angle} , $E_{dihedral}$ y $E_{improper}$ corresponden a la energía asociada a los enlaces, a los ángulos, a los ángulos diedros y a los ángulos diedros impropios, respectivamente. En cambio, $E_{crossterms}$ es para tener en cuenta el acoplamiento que existe entre las cuatro contribuciones que acabamos de presentar. Por otra parte, $E_{no\ enlazante}$ se puede expresar como sigue:

$$E_{no\ enlazante} = E_{VDW} + E_{electrostatic} \quad (5)$$

donde E_{VDW} y $E_{electrostatic}$ corresponden a la energía asociada a las interacciones no enlazantes de carácter no electrostático, también denominadas interacciones de Van der Waals, y a las interacciones no enlazantes de carácter electrostático, respectivamente. Una vez presentadas las diferentes contribuciones de $E_{enlazante}$ y $E_{no\ enlazante}$, ya se está en condiciones de asimilar la expresión genérica desarrollada de E_{MM} .

$$E_{MM} = \sum_{enlaces} k_d (d - d_0)^2 + \sum_{ángulos} k_\theta (\vartheta - \vartheta_0)^2 + \sum_{diedros} k_\varphi [1 + \cos(n\varphi + \delta)] + \sum_{pares\ AB\ no\ enlazantes} \left\{ 4\varepsilon_{AB} \left[\left(\frac{\sigma_{AB}}{r_{AB}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{AB}}{r_{AB}} \right)^6 \right] + \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \frac{q_A q_B}{r_{AB}} \right\} \quad (6)$$

donde $E_{enlazante}$ viene dada por los tres primeros términos, los cuales representan a $E_{bonding}$, E_{angle} y $E_{dihedral}$, respectivamente, mientras que $E_{no\ enlazante}$ viene dada por el cuarto término donde la primera parte de dicho término corresponde a E_{VDW} mientras que la segunda parte corresponde a $E_{electrostatic}$.

Respecto a las interacciones enlazantes, en general, los enlaces se tratan como muelles, es decir, se describen mediante un potencial armónico (ley de Hooke) donde la distancia de referencia d_0 es igual a la longitud de enlace experimental u obtenida con un nivel superior

de cálculo. Es importante notar que cuando la distancia de enlace d es cercana al valor de referencia entonces la aproximación armónica funciona bien, en cambio, si existe una gran distorsión del enlace entonces su energía alcanza valores muy altos, cosa que hace necesaria la incorporación de cierta anarmonicidad en dicho potencial. Similarmente, los ángulos también se describen mediante un potencial armónico donde ϑ_0 representa el valor de referencia del ángulo, mientras que ϑ representa el valor actual del ángulo. Por otra parte, los ángulos diedros se describen mediante una expansión en serie de cosenos donde φ corresponde al ángulo diedro, n corresponde a la multiplicidad, que es el número de mínimos que presenta la función tras una rotación de 360° , y δ corresponde a la fase que determina para qué valores de φ el ángulo diedro considerado presenta los mínimos. Vale la pena mencionar que la ecuación 6 no incorpora términos explícitos para $E_{improper}$ y $E_{crossterms}$ debido a que no tienen una expresión matemática genérica. De hecho, la expresión matemática de $E_{improper}$ varía en función de los ángulos diedros impropios, mientras que $E_{crossterms}$ no se acostumbra a incorporar en los *force field* habituales.

Respecto a las interacciones no enlazantes, es importante notar que como norma general dependen de potencias inversas de la distancia de los átomos que interactúan. E_{VDW} viene descrito por un potencial de Lennard-Jones 12-6 donde r_{AB} es la distancia entre los átomos que interactúan, ε_{AB} es la profundidad del pozo de potencial y σ_{AB} corresponde a la distancia finita en la cual la interacción de Van der Waals entre un par de átomos dados es nula, mientras que las interacciones electrostáticas vienen descritas por la ley de Coulomb donde q_A y q_B corresponden a las cargas atómicas del par de átomos considerados y ε_0 es la constante dieléctrica.

Es preciso destacar que el proceso de parametrización de un *force field*, es decir, la obtención del conjunto de parámetros que permite implementarlo (las constantes de fuerza k_d , k_ϑ y k_φ , la distancia de referencia d_0 , el ángulo de referencia ϑ_0 , la profundidad del pozo ε_{AB} , el radio de Van der Waals σ_{AB} y las cargas atómicas q_A y q_B) los cuales o bien son empíricos o bien se han determinado mediante cálculos QM de moléculas modelo, es probablemente la tarea más exigente, ya que estos parámetros tienen que reproducir de manera adecuada propiedades moleculares en el entorno considerado, y tienen que ser transferibles, es decir, un conjunto de parámetros dados tiene que poderse aplicar a sistemas similares sin la necesidad de desarrollar nuevos conjuntos de parámetros para dichos sistemas. Por otra parte, cada *force field* posee su propia expresión matemática, su propio conjunto de parámetros y una serie de características internas que le permiten describir unos sistemas mejor que otros. Por ejemplo, AMBER²⁰⁴, CHARMM²⁰⁵ y GROMOS²⁰⁶ son *force fields* especialmente preparados para aplicaciones biomoleculares los cuales están especialmente diseñados para tratar polímeros biomoleculares y todos ellos han demostrado que proporcionan una exactitud similar y una descripción adecuada de las propiedades moleculares. En este tipo de *force fields*, las biomoléculas comunes tales como proteínas, ADN, lípidos y azúcares disponen de parámetros específicamente obtenidos para éstas, sin embargo, para los ligandos no acostumbra a ser así y su parametrización particular puede ser delicada.

En la presente tesis se ha utilizado el *force field* de AMBER para realizar los cálculos a nivel MM, cosa que en gran parte ha sido motivada por el hecho de que este *force field* es específico de los sistemas que hemos estudiado y porque está implementado en muchos

tipos de cálculos diferentes tales como MDs (sobre superficies de energía potencial a nivel MM o QM), cálculos QM/MM, cálculos QM semiempíricos y cálculos de energía de Gibbs a partir de MDs previas. Además, dispone de *software* propio para analizar los cálculos realizados utilizando dicho *force field*, que recibe el nombre de AMBERTools, y de gran cantidad de documentación y soporte que facilitan en gran medida la resolución de problemas cuando éstos aparecen en la realización o análisis de cálculos.

2.1.3 Dinámica Molecular

Como se ha comentado anteriormente, los complejos de Michaelis enzima-ligando son sistemas extraordinariamente grandes y por lo tanto tienen muchísimos grados de libertad, cosa que hace que muchas conformaciones diferentes tengan energías muy similares y sea necesario realizar una exploración conformacional con el objetivo de obtener un conjunto de estructuras representativas de dicho complejo para poderlo estudiar. Dinámica Molecular y Monte Carlo son las dos técnicas principales para producir estructuras representativas de un sistema a una temperatura finita, aunque en la presente tesis se han utilizado exclusivamente las simulaciones de MD para realizar dicho cometido. La MD proporciona la teoría necesaria para estudiar la evolución temporal de sistemas, donde la primera aparición de dicha teoría tuvo lugar al final de los años 50 cuando Alder y Wainwright estudiaron la interacción de esferas rígidas para explicar el comportamiento de los líquidos²⁰⁷. Sin embargo, debido a su complejidad, no fue hasta 1977 cuando McCammon, Gelin y Karplus realizaron la primera simulación de una proteína, *bovine pancreatic trypsin inhibitor* (BPTI)²⁰⁸. Recientemente, el desarrollo de las unidades de procesamiento gráfico (GPUs)²⁰⁹ ha permitido incrementar el tiempo de simulación sustancialmente. Las GPUs modernas están constituidas por cientos de unidades aritméticas que se aprovechan para acelerar enormemente cálculos numéricamente intensivos. De hecho, hoy en día, las simulaciones estándar de MD a nivel MM, que son las que se han utilizado en la presente tesis, soportan sistemas que contienen hasta 1,000,000 de átomos sin dificultades²¹⁰ y los tiempos de simulación alcanzan los cientos de nanosegundos, cosa que hace unos pocos años se consideraba impensable.

2.1.3.1 Ecuaciones de movimiento

Una simulación de MD genera una serie de puntos correlacionados temporalmente en el espacio de fases, una trayectoria, propagando un conjunto inicial de coordenadas y velocidades. Si se trata de una simulación de MD clásica, entonces el movimiento de los átomos del sistema se calcula aplicando la segunda ley de Newton.

$$\vec{F}_i(\vec{r}_i, \dots, \vec{r}_N) = m_i \vec{a}_i = -\frac{\partial V(\vec{r}_i, \dots, \vec{r}_N)}{\partial \vec{r}_i} ; i = 1, \dots, N \quad (7)$$

donde \vec{F}_i es la fuerza que actúa sobre el átomo i , m_i , \vec{a}_i y \vec{r}_i corresponden a la masa, a la aceleración y a la posición de dicho átomo, respectivamente y V es la función energía potencial del sistema, la cual corresponde a un *force field* (ver ecuación 6) en una

simulación de MD sobre una superficie de energía potencial (PES) MM. Entonces, se tiene un conjunto de $3N$ ecuaciones diferenciales de segundo orden que al resolverlas proporcionan las posiciones y velocidades de los átomos en función del tiempo ($\vec{r}_i(t)$, $\vec{v}_i(t)$), o lo que es lo mismo, sus trayectorias. Es importante notar que este tipo de potenciales son continuos, es decir, la fuerza que actúa sobre un átomo dado cambia o bien cuando su posición cambia o bien cuando la posición de cualquier átomo que interactúe con éste cambia. Por lo tanto, el movimiento de todos los átomos está acoplado entre sí, dando lugar a lo que se conoce como problema de muchos cuerpos, el cual no tiene una solución analítica. Con el objetivo de eludir el problema que se acaba de comentar, dichas ecuaciones diferenciales de movimiento se resuelven numéricamente empleando el método de diferencias finitas. Es decir, estas ecuaciones se integran usando un algoritmo de integración donde el intervalo de tiempo en el cual se calculan dichas integrales recibe el nombre de *time step* (δt). Es preciso remarcar que al emplear tal manera de proceder, el tiempo se discretiza durante la integración y las fuerzas que actúan sobre los diferentes átomos se consideran constantes durante cada paso, las cuales se calculan al inicio de cada uno a partir de las posiciones y velocidades anteriores conduciendo a nuevas posiciones y velocidades. Por otra parte, todos los algoritmos de integración de las ecuaciones de movimiento se basan en expansiones de Taylor truncadas de las posiciones y propiedades dinámicas (velocidades, aceleraciones, ...) de los átomos. De entre todos los algoritmos de integración existentes, el algoritmo de Verlet²¹¹ es el más utilizado, donde el paso siguiente a tiempo $t+\delta t$ se calcula a partir del paso previo a tiempo $t-\delta t$ y del paso actual a tiempo t . Sin embargo, este algoritmo presenta dos desventajas importantes: 1) las velocidades no aparecen explícitamente en sus ecuaciones de propagación, cosa que conduce a que la temperatura no se mantenga constante; 2) el cálculo de las nuevas posiciones suele llevar asociado errores numéricos importantes por la resta de números grandes. El algoritmo *leap-frog*²¹², una variante del algoritmo de Verlet, subsana las desventajas de dicho algoritmo mediante la expresión explícita de las velocidades y la mejora de la exactitud numérica. A pesar de estas mejoras, este algoritmo no calcula las posiciones y velocidades al mismo tiempo. Cabe destacar que el algoritmo *velocity-Verlet*²¹³, el cual es una combinación del algoritmo de Verlet y del algoritmo *leap-frog*, corrige las deficiencias de los dos algoritmos explicados y proporciona las posiciones, velocidades y aceleraciones simultáneamente sin comprometer la precisión. En la presente tesis se han realizado las simulaciones de MD utilizando un módulo interno de AMBER que recibe el nombre de *pmemd*²¹⁴, el cual emplea el algoritmo *velocity-Verlet*. En último lugar, es importante notar que la correcta elección del *time step* es crucial para realizar simulaciones de MD, ya que *time steps* muy cortos proporcionan mayor exactitud, pero ralentizan el cálculo. Por el contrario, *time steps* demasiado grandes pueden conducir a inestabilidades en el integrador de las ecuaciones de movimiento. Con el objetivo de acelerar los cálculos de las simulaciones de MD sin comprometer la integridad de éstos, se acostumbra a fijar las longitudes y ángulos de los enlaces que involucran átomos de hidrógeno mediante el algoritmo SHAKE²¹⁵, cosa que también se ha puesto en práctica en esta tesis.

2.1.3.2 Hipótesis ergódica y colectivos NVT y NPT

Como es de esperar, las simulaciones de MD proporcionan magnitudes microscópicas del sistema, ya que exploran su espacio de fase. Sin embargo, también se pueden obtener magnitudes macroscópicas a partir de las simulaciones de MD utilizando la hipótesis ergódica. Es preciso destacar que existe la hipótesis ergódica aplicada a las simulaciones de MD y la hipótesis ergódica que incorpora la mecánica estadística. En referencia a las simulaciones de MD, la hipótesis ergódica establece que en una simulación de MD suficientemente larga se explora el espacio configuracional con una probabilidad correspondiente a la distribución de Boltzmann. En cambio, la hipótesis ergódica de la mecánica estadística establece que un sistema que evoluciona a lo largo del tiempo siguiendo una distribución de Boltzmann es equivalente a un colectivo de sistemas en un momento dado, la cual se puede expresar matemáticamente de la siguiente manera:

$$\overline{A_{colectivo}} = \overline{A_{temporal}} = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \int_0^{\tau} A(\overrightarrow{r_N(t)}, \overrightarrow{p_N(t)}) dt \quad (8)$$

donde A es una magnitud cualquiera del sistema, $A(\overrightarrow{r_N(t)}, \overrightarrow{p_N(t)})$ es el valor instantáneo de la magnitud A , τ es el tiempo de medida y $\overline{A_{colectivo}}$ y $\overline{A_{temporal}}$ son las medias sobre el colectivo de sistema y temporal, respectivamente. Es importante notar que la ecuación 8 pone de manifiesto que, en el contexto de la mecánica estadística, la media sobre el colectivo intemporal es equivalente a la media temporal si el tiempo es infinito. Entonces, considerando ambas hipótesis ergódicas, la aplicación práctica de las simulaciones de MD es generar una trayectoria que describa cómo varían las variables dinámicas de un sistema a lo largo del tiempo y a partir de dicha trayectoria calcular las diferentes medias temporales que serán equivalentes a las medias sobre el colectivo donde la siguiente expresión permite obtener estas medias temporales:

$$\overline{A_{colectivo}} = \overline{A_{temporal}} = \frac{1}{M} \sum_{t=0}^M A_t(\overrightarrow{r_N(t)}, \overrightarrow{p_N(t)}) \quad (9)$$

donde M es el número de pasos de la trayectoria que se han considerado para calcular la media y $A_t(\overrightarrow{r_N(t)}, \overrightarrow{p_N(t)})$ es el valor de la magnitud cualquiera A escogida para calcular dicha media en el paso t . Cabe destacar que en las simulaciones de MD siempre se están aplicando estas dos aproximaciones: 1) la trayectoria generada no es infinita; 2) la trayectoria generada no es continua.

Por otra parte, las magnitudes termodinámicas en una simulación de MD presentan siempre el mismo comportamiento, al inicio de la simulación fluctúan, ya que el sistema no se encuentra en equilibrio termodinámico, mientras que a partir de un cierto tiempo, cuando el sistema ya se ha equilibrado, dichas magnitudes se estabilizan y fluctúan alrededor de un valor medio. Vale la pena mencionar que estas últimas fluctuaciones tienen sentido físico, es decir, éstas no provienen de problemas numéricos y vienen dadas por la siguiente expresión:

$$\overline{(\Delta A)^2} = \overline{(A - \bar{A})^2} \propto \frac{1}{\sqrt{N}} \quad (10)$$

donde N es el número de átomos del sistema y A una magnitud termodinámica cualquiera de dicho sistema. La ecuación 10 muestra que cuanto más grande es un sistema más pequeñas son las fluctuaciones de las magnitudes termodinámicas de éste, cosa que hace que al medir magnitudes termodinámicas de sistemas macroscópicos parezca que éstas son constantes, ya que las fluctuaciones que presentan son demasiado pequeñas para poder ser medidas.

Finalmente, dado que se pueden extraer magnitudes macroscópicas de las simulaciones de MD, tal y como se ha expuesto en este apartado, es interesante que éstas recreen las condiciones experimentales de laboratorio para poder comparar resultados de simulaciones y experimentos. Por lo tanto, las simulaciones de MD de sistemas que se encuentran en fase condensada, como es el caso de las enzimas, se acostumbran a calcular a presión y temperatura constantes, colectividad isotérmica-isobárica (NPT), o a volumen y temperatura constantes, colectividad canónica (NVT), ya que éstas son las condiciones experimentales más usuales de dichos sistemas. Con el objetivo de simular estas condiciones experimentales se acopla el sistema a un reservorio de manera determinista o estocástica. Es importante notar que los acoplamientos estocásticos son más fáciles de implementar y proporcionan estabilidad dinámica mediante sus términos de fricción. En las simulaciones de MD realizadas para la presente tesis, la temperatura y la presión se han controlado mediante dinámica de Langevin²¹⁶ y baróstato de Berendsen²¹⁷, respectivamente.

2.1.3.3 Condiciones de contorno: Condiciones de frontera periódicas

En las simulaciones de MD de sistemas en fase condensada, tal y como son las enzimas o los complejos enzima-sustrato en disolución acuosa estudiados en esta tesis, la frontera del sistema tiene que reproducir este efecto. El enfoque que se ha utilizado en las simulaciones de MD de esta tesis es el de condiciones de frontera periódicas (PBC). Durante una simulación bajo tales condiciones, el sistema está rodeado por imágenes idénticas en todas las posibles direcciones con el objetivo de simular su total solvatación. En estas condiciones, las partículas del sistema experimentan fuerzas como si estuviesen en solución. Cuando una partícula abandona el sistema, ésta es inmediatamente sustituida por una partícula imagen que entra por el lado opuesto al de su salida y las coordenadas de las imágenes son idénticas a las del sistema excepto por la adición o sustracción de múltiplos de los lados de la caja, dado que las enzimas o complejos enzima-sustrato han sido solvatados explícitamente mediante una caja rectangular o cuadrada de moléculas de agua. La interacción del sistema con las imágenes de éste que lo rodean simula al sistema en una solución macroscópica, sin embargo, la única limitación de este enfoque es que al ser las imágenes idénticas al sistema se está simulando un cristal, cosa que no se corresponde con la realidad, ya que las soluciones no son periódicas.

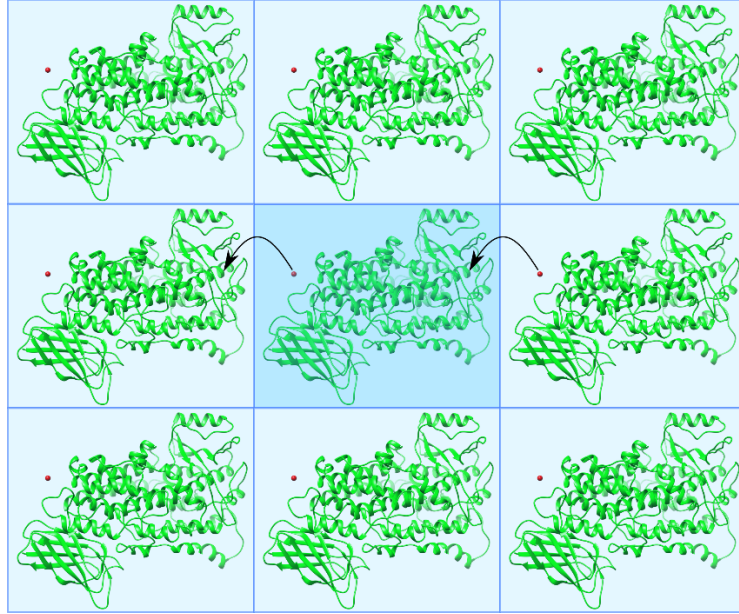


Figura 18. Ilustración de las condiciones periódicas de frontera donde sólo se han representado las cajas en el plano de la página por claridad. La esfera roja representa una molécula de agua que cuando abandona el sistema es inmediatamente sustituida por una molécula de agua de una imagen del sistema. El sistema real (caja central) está resaltado con un azul más oscuro que las imágenes de dicho sistema.

2.1.4 Mecánica Cuántica

En el contexto de la química, la mecánica cuántica trata de manera explícita la estructura electrónica de los átomos y moléculas, cosa que permite estudiar las propiedades químicas de un sistema tal como la reactividad (formación y rotura de enlaces). Es importante notar que la QM se basa en resolver la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo (ecuación 11).

$$\hat{H}(\vec{r}, \vec{R}) \Psi(\vec{r}, \vec{R}) = E \Psi(\vec{r}, \vec{R}) \quad (11)$$

donde \hat{H} es el hamiltoniano que describe el sistema, Ψ es la función de onda del sistema y E es la energía total del estado descrito por Ψ , la cual contiene toda la información del sistema, y en el caso particular de un sistema molecular formado por un conjunto de electrones de coordenadas \vec{r} y un conjunto de núcleos de coordenadas \vec{R} se puede escribir como $\Psi(\vec{r}; \vec{R})$. Es decir, la función de onda depende de las coordenadas de los electrones y de los núcleos de manera no separable. Esta descripción del sistema es rigurosa pero extremadamente compleja, cosa que hace que sea computacionalmente inalcanzable en la gran mayoría de casos, ya que el hamiltoniano para un sistema molecular se escribe de la siguiente manera:

$$\hat{H} = - \sum_i \frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_i^2 - \sum_k \frac{\hbar^2}{2m_k} \nabla_k^2 - \sum_i \sum_k \frac{e^2 Z_k}{r_{ik}} + \sum_{i < j} \frac{e^2}{r_{ij}} + \sum_{k < l} \frac{e^2 Z_k Z_l}{r_{kl}} \quad (12)$$

donde i y j representan a los electrones, k y l representan a los núcleos, \hbar es la constante de Planck dividida por 2π , m_e y m_k representan la masa de los electrones y de los núcleos, respectivamente, ∇^2 es el operador de Laplace, e es la carga eléctrica elemental, Z_k y Z_l representan el número atómico de los núcleos considerados y r_{ij} , r_{ik} y r_{kl} representan la distancia entre las partículas correspondientes.

La ecuación 11 es muy compleja de resolver. De hecho, dicha ecuación ya no tiene solución analítica en un sistema tan simple como el que conforma un núcleo y dos electrones, y se ha de simplificar. La aplicación de la aproximación Born-Oppenheimer hace factible la resolución de la ecuación 11 para sistemas relativamente grandes con la potencia computacional que se dispone hoy en día. Dicha aproximación consiste en desacoplar el movimiento electrónico del movimiento nuclear debido a que los núcleos son mucho más masivos que los electrones. Por lo tanto, el segundo término del segundo miembro de la ecuación 12 se puede despreciar, ya que en base a la diferencia de masas comentada, el desplazamiento de los núcleos es mucho más lento que el de los electrones y entonces la nube electrónica se adapta a cambios en las posiciones de los núcleos mucho más rápido que éstos se vuelvan a desplazar, cosa que hace que se pueda entender que los electrones se mueven bajo un potencial Coulómbico generado por los núcleos fijados en unas determinadas posiciones. Es decir, el quinto término del segundo miembro de la ecuación 12, que es el que corresponde a la repulsión entre núcleos (V_{NN}), se puede considerar constante para una configuración nuclear dada. Aplicando todas las aproximaciones que se han expuesto, la ecuación 11 queda como sigue:

$$\widehat{H}_e(\vec{r}, \vec{R}) \Psi_e(\vec{r}; \vec{R}) = E_e \Psi_e(\vec{r}; \vec{R}) \quad (13)$$

donde $\Psi_e(\vec{r}; \vec{R})$ corresponde a la función de onda electrónica la cual depende explícitamente de las coordenadas electrónicas \vec{r} y paramétricamente de las coordenadas nucleares \vec{R} , E_e es la energía electrónica y $\widehat{H}_e(\vec{r}, \vec{R})$ corresponde al hamiltoniano electrónico que viene descrito por la siguiente expresión:

$$\widehat{H}_e = - \sum_i \frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_i^2 - \sum_i \sum_k \frac{e^2 Z_k}{r_{ik}} + \sum_{i < j} \frac{e^2}{r_{ij}} \quad (14)$$

Es importante notar que en los sistemas moleculares se acostumbra a definir la energía potencial U (ecuación 15) como la suma de la energía electrónica E_e y la energía potencial de repulsión entre núcleos V_{NN} , la cual varía cuando cambia la configuración nuclear, es decir, depende explícitamente de las coordenadas nucleares \vec{R} .

$$U(\vec{R}) = E_e + V_{NN}(\vec{R}) \quad (15)$$

Si se calcula U para todas las configuraciones nucleares \vec{R} posibles se obtiene lo que se denomina superficie de energía potencial (PES), o lo que es lo mismo, la PES es una hipersuperficie definida por la energía potencial U de un conjunto de átomos dados sobre

todas sus configuraciones nucleares \vec{R} posibles, donde cada configuración nuclear constituye un punto de la PES. Mediante la exploración de la PES, se pueden calcular algunos observables físicos, estudiar los cambios energéticos de procesos químicos y caracterizar estructuras que son químicamente relevantes. Para identificar estas estructuras, sólo son necesarias primeras y segundas derivadas de la PES, ya que las estructuras químicamente relevantes corresponden a los siguientes puntos de dicha superficie: 1) mínimos locales, puntos que son mínimos en todas las direcciones, que corresponden a estructuras moleculares optimizadas, es decir, a reactivos, productos o intermedios de reacción; 2) puntos de silla, puntos que son mínimos en todas las direcciones excepto en una, en la cual corresponden a un máximo, que determinan las barreras más bajas de energía en los caminos de reacción que conectan reactivos, productos e intermedios de reacción entre sí, los cuales, según la teoría del estado de transición, corresponden a los estados de transición (TS). Cabe destacar que el análisis de la PES mediante la localización de mínimos y puntos de silla es equivalente a modelizar el sistema a una temperatura de cero Kelvin, donde todas las moléculas se encuentran en sus estados fundamentales electrónicos, vibracionales (aunque no se tiene en cuenta la corrección vibracional de punto cero) y rotacionales. Aunque se pueden incorporar los efectos de una temperatura finita (ver sección 2.1.6), dicha incorporación es compleja y este enfoque más simple ya permite el estudio de procesos químicos.

Finalmente, aunque la ecuación de Schrödinger que aparece en la ecuación 13 (ecuación de Schrödinger electrónica) es sustancialmente más simple que la original (ecuación 11), en general, no se puede resolver de manera analítica y se ha de resolver numéricamente. Para dicha resolución numérica, se pueden clasificar los métodos de resolución en dos categorías, los métodos basados en la función de onda y los métodos basados en la densidad electrónica, también conocidos como métodos DFT, donde éstos últimos han sido los utilizados en esta tesis.

2.1.4.1 Métodos basados en la función de onda

Sin entrar en demasiado detalle, una manera de resolver la ecuación de Schrödinger es encontrar funciones que la cumplan, es decir, que una vez aplicado el hamiltoniano sobre dichas funciones, se obtengan éstas multiplicadas por un cierto valor que corresponderá a la energía asociada al estado descrito por estas funciones. Además, este tipo de funciones se pueden combinar entre sí para que el estado descrito por la combinación resultante tenga unas determinadas propiedades. El método de Hartree-Fock fue el primero en utilizar este enfoque para resolver la ecuación de Schrödinger para sistemas moleculares. Dicho método, describe a los electrones de un sistema molecular asociándoles a cada uno un spin-orbital y expresa la función de onda del sistema como un determinante de Slater, el cual es un producto antisimétrico de estos spin-orbitales, donde esta antisimetría es necesaria debido a que los electrones son partículas con spin 1/2:

$$\Psi(1, 2, \dots, N) = (N!)^{\frac{1}{2}} \sum_{q=1}^{N!} (-1)^{p_q} \widehat{P}_q \{ \chi_i(1) \chi_j(2) \dots \chi_k(N) \} \quad (16)$$

donde N es el número de electrones, χ_i son los spin-orbitales, \widehat{P}_q es el operador permutación y p_q es el número de transposiciones necesarias para obtener la permutación. Es necesario subrayar que el método Hartree-Fock presenta una limitación clara para sistemas polielectrónicos, ya que no considera la correlación electrónica entre los electrones de diferente spin, es decir, cada electrón percibe el resto de electrones como un campo eléctrico promedio. Dicha limitación, hace que este método no sea adecuado para describir sistemas con electrones desapareados o donde se forman y rompen enlaces. Con el objetivo de resolver esta problemática, se desarrollaron los métodos post-Hartree-Fock, tales como métodos de Interacción de Configuraciones, métodos de *Coupled Cluster* y métodos de Teoría de Perturbaciones²¹⁸, los cuales incorporan la correlación electrónica, pero son caros computacionalmente para sistemas de un cierto tamaño.

2.1.4.2 Métodos DFT

Los métodos DFT, los cuales se fundamentan en la teoría del funcional de la densidad (DFT), son extensamente utilizados en aplicaciones biomoleculares, ya que incorporan la correlación electrónica y presentan una relación coste computacional-exactitud favorable. La DFT se basa en la idea de que la energía electrónica del sistema E_e se puede expresar en función de la densidad electrónica ρ donde $\rho(\vec{r})$ representa la densidad electrónica en el punto \vec{r} . Es decir, la energía electrónica, que en este apartado se denotará como E para mantener la notación que emplean la mayoría de textos de esta temática, es un funcional de la densidad electrónica ρ donde $E[\rho]$ asume un único valor para cada valor de ρ .

La principal ventaja de los métodos DFT respecto los métodos basados en la función de onda es que, en general, los primeros obtienen E utilizando muchas menos variables que los segundos, ya que para un sistema de N electrones, ρ , a partir de la cual calculan E los métodos DFT, únicamente depende de las tres coordenadas espaciales independientemente del tamaño del sistema, mientras que Ψ , a partir de la cual calculan E los métodos basados en la función de onda, depende de $4N$ variables, ya que cada electrón del sistema viene descrito por tres coordenadas espaciales y una coordenada de spin. Este hecho hace que los métodos DFT sean especialmente adecuados para sistemas grandes, tal y como los que tratamos en la presente tesis.

La teoría del funcional de la densidad se fundamenta en dos teoremas desarrollados por Hohenberg y Kohn en 1964²¹⁹.

Primer Teorema: Cualquier observable de un estado estacionario electrónico fundamental no degenerado puede ser calculado, teóricamente de manera exacta, a partir de la densidad electrónica del estado fundamental, es decir, cualquier observable puede ser escrito como un funcional de la densidad electrónica del estado fundamental.

Por lo tanto, se puede establecer una correspondencia entre la densidad electrónica y la energía electrónica:

$$E[\rho] = T_e[\rho] + V_{Ne}[\rho] + V_{ee}[\rho] \quad (17)$$

donde $T_e[\rho]$ corresponde a la energía cinética de los electrones, $V_{Ne}[\rho]$ es la energía potencial de atracción entre núcleos y electrones, $V_{ee}[\rho]$ es la energía potencial de repulsión entre electrones. Es importante notar que no se conoce la forma exacta de $T_e[\rho]$ ni de $V_{ee}[\rho]$, cosa que hace que no podamos calcular $E[\rho]$ aplicando directamente la ecuación 17.

Segundo Teorema: La densidad electrónica de un estado electrónico fundamental no degenerado puede ser calculada, en principio de manera exacta, determinando la densidad electrónica que minimiza la energía del estado fundamental.

Entonces, para cualquier densidad de prueba $\tilde{\rho}(\vec{r})$ tenemos asegurado que se cumple la siguiente desigualdad:

$$E_0 \leq E_v[\tilde{\rho}(\vec{r})] \quad (18)$$

donde E_0 es la energía electrónica del estado fundamental y E_v es la energía electrónica asociada a esta densidad de prueba. En 1965 Kohn y Sham²²⁰ propusieron un método que permitía calcular $T_e[\rho]$ y establecer una cota superior de E_0 , la cual se puede refinar iterativamente hasta un cierto límite, a partir de ρ . Este método se basa en un sistema ficticio de N electrones que no interactúan entre sí donde éstos vienen descritos por funciones de onda monoeléctricas, tal que este sistema ficticio presenta la misma densidad electrónica que el sistema real donde los electrones interactúan entre sí. Entonces, el funcional de la energía electrónica se puede reescribir como:

$$E_v[\rho] = T_s[\rho] + \int \vartheta_n(\vec{r})\rho(\vec{r})d\vec{r} + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (19)$$

donde $T_s[\rho]$ es la energía cinética electrónica del sistema ficticio, $\vartheta_n(\vec{r})$ es el potencial externo que actúa sobre estos electrones que no interactúan, $J[\rho]$ es la energía de Coulomb y $E_{xc}[\rho]$ es la energía de intercambio y correlación. Cabe destacar que el principal problema de la teoría del funcional de la densidad proviene de $E_{xc}[\rho]$, ya que no se conoce su expresión exacta y acumula todo el error de $E_v[\rho]$. El funcional $E_{xc}[\rho]$ contiene la contribución potencial de intercambio de los electrones, asociada a la interacción entre los electrones que tienen el mismo spin, la contribución potencial de correlación electrónica, asociada a la interacción entre los electrones que tienen spin opuesto y la energía de correlación cinética. Existen diferentes enfoques para calcular $E_{xc}[\rho]$ o $\varepsilon_{xc}[\rho]$, que es la energía de intercambio y correlación por partícula, cosa que conduce a los diferentes métodos DFT conocidos. De menos a más exactos, estos métodos son: 1) *Local Density Approximation* (LDA) donde ε_{xc} únicamente depende de la densidad electrónica y las contribuciones de correlación e intercambio se tratan de manera separada; 2) *Local Spin Density Approximation* (LSDA) que se emplea para sistemas de capa abierta y trata las contribuciones de spin α y β de manera separada; 3) *Non-local Corrections or Generalized Gradient Approximations* (GGA) que introducen los gradientes de la densidad electrónica $\vec{\nabla}\rho$ en la descripción de los efectos de correlación e intercambio. Por lo tanto, estos métodos no sólo tienen en cuenta la densidad electrónica

en cada punto, sino que también tienen en cuenta la variación de la densidad electrónica en cada punto; 4) *Meta-GGA Approximation* que aparte de incluir los términos de la aproximación GGA, adicionalmente, también incluye la densidad de energía cinética $\tau(\vec{r})$.

2.1.5 Métodos QM/MM

La metodología *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics* (QM/MM) es un enfoque teórico que combina tanto la metodología MM como la QM, constituyendo la manera más completa de estudiar procesos químicos en sistemas complejos. En 1972, comenzó la era QM/MM mediante un artículo de Warshel y Karplus que introducía el concepto y la metodología QM/MM²²¹, la cual contenía algunos rasgos característicos que hoy en día son esenciales en este tipo de cálculos. Posteriormente, en 1976, se presentaron los primeros estudios que aplicaban la metodología QM/MM a reacciones enzimáticas, los cuales fueron realizados por Warshel y Levitt²²². Sin embargo, no fue hasta 1990 cuando este enfoque empezó a ser extensamente utilizado gracias al artículo de Field, Bash y Karplus donde se describe en detalle el acoplamiento de métodos QM con métodos MM²²³. Además, en dicho artículo se evalúa la precisión y exactitud del tratamiento QM/MM comparándolo con datos *ab initio* y experimentales. A lo largo de estas tres últimas décadas, se han publicado bastantes trabajos sobre el desarrollo de métodos QM/MM y hoy en día, la metodología QM/MM es una herramienta de enorme valor no sólo para estudiar sistemas biomoleculares²²⁴, sino también para estudiar sistemas inorgánicos, organometálicos, en fase sólida y con solvente explícito. Por todo esto, en 2013 se les otorgó a Karplus, Levitt y Warshel el premio Nobel de química por el desarrollo de modelos multiescala para sistemas químicos complejos²²⁵⁻²²⁷.

2.1.5.1 Perspectiva general

Si a un sistema (S) se le aplica un tratamiento QM/MM, éste se divide en dos regiones, la región interna o región QM (I) que se trata mecanocuánticamente y la región externa o región MM (O) que se trata con un *force field*. Es importante notar que la energía total del sistema no se puede calcular directamente como la suma de las energías de los subsistemas, ya que existen interacciones QM-MM. Es decir, los dos subsistemas están acoplados y se deben tener en cuenta los términos de acoplamiento entre éstos. Por otra parte, la frontera entre la región QM y la región MM se debe tratar con especial precaución, ya que es una zona problemática debido a que existe una discontinuidad donde se pasa de un tratamiento QM a un tratamiento MM. Finalmente, es preciso destacar que los cálculos QM/MM aprovechan que, normalmente, la región del espacio dentro de la cual se producen cambios significativos en la estructura electrónica, que correspondería a la región interna o QM, es relativamente pequeña comparada con el tamaño total del sistema, consiguiendo reducir el coste computacional sin dejar de tratar adecuadamente la zona reactiva del sistema mediante el uso de la partición que se ha comentado. Además, a lo largo de dichos cálculos, la partición QM/MM establecida puede mantenerse fija o variable.

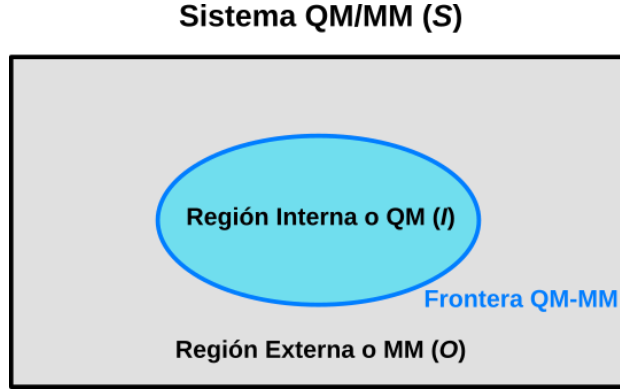


Figura 19. Representación esquemática de la partición QM/MM de un sistema (S) donde la región interna o QM (I) está indicada en azul, mientras que la región externa o MM (O) está indicada en gris. La frontera QM-MM está representada por una línea gruesa en un azul más intenso que el de la región QM.

2.1.5.2 Expresión de la energía QM/MM

Se pueden clasificar los esquemas QM/MM según su expresión para la energía total. De acuerdo con esta clasificación, existen dos enfoques totalmente opuestos, el aditivo y el sustractivo.

El esquema sustractivo calcula la energía total a partir de tres cálculos: 1) cálculo a nivel MM de todo el sistema; 2) cálculo a nivel QM de la región interna; 3) cálculo a nivel MM de la región interna. De manera que la energía total QM/MM se puede obtener a partir de la siguiente expresión:

$$E_{QM/MM}^{sub}(S) = E_{MM}(S) + E_{QM}(I+L) - E_{MM}(I+L) \quad (20)$$

Vamos a realizar una breve aclaración sobre la notación utilizada en esta sección antes de comentar la ecuación anterior. Dentro de la presente sección, en general, los superíndices se van a utilizar para indicar el esquema o tipo de interacción considerado, los subíndices van a indicar el nivel de cálculo utilizado y entre paréntesis se va a indicar la región considerada. Según la ecuación 20, este esquema es equivalente a tratar todo el sistema a nivel MM excepto una cierta región del espacio que se trata a nivel QM. Es importante notar que la igualdad anterior se cumple para un esquema de *link atoms* (ver sección 2.1.5.3.1) donde L hace referencia a dichos átomos. Dado que dicho esquema ha sido el empleado para tratar la frontera QM-MM en la presente tesis, todas las ecuaciones que hagan referencia a cálculos QM/MM se van a escribir de manera que se cumplan para este esquema de *link atoms*.

La principal ventaja del esquema sustractivo reside en su simplicidad, ya que no requiere términos de acoplamiento y los procedimientos estándar QM y MM se pueden aplicar sin ninguna modificación. Además, este esquema también corrige los artefactos de cálculo debidos a los *link atoms*, siempre y cuando los términos de fuerza MM en los cuales están involucrados dichos átomos reproduzcan razonablemente el potencial QM. Sin embargo, el esquema sustractivo presenta algunas desventajas y limitaciones, donde las más destacadas son: 1) necesidad de parámetros MM para tratar el subsistema interno a nivel

MM, los cuales no son fáciles de deducir; 2) el acoplamiento QM-MM se trata a nivel MM, cosa que causa problemas especialmente con las interacciones electrostáticas. Por otra parte, la energía total QM/MM para el esquema aditivo se puede expresar de la manera siguiente:

$$E_{QM/MM}^{add}(S) = E_{MM}(O) + E_{QM}(I+L) + E_{QM-MM}(I, O) \quad (21)$$

Tal y como indica la ecuación 21, en el esquema aditivo sólo se calcula la energía a nivel MM de la región externa, mientras que similarmente al esquema sustractivo, la región interna $I+L$ se trata a nivel QM. Además, se incorpora un término de acoplamiento explícito, $E_{QM-MM}(I, O)$, que reúne todas las interacciones entre los dos subsistemas. Actualmente, de los dos esquemas, el aditivo es el más utilizado, y él utilizado en esta tesis, a pesar de presentar un mayor coste computacional ya que describe las interacciones existentes entre ambas regiones de manera más exacta. Cabe destacar que los métodos QM/MM que utilizan el esquema aditivo se diferencian entre sí únicamente por la expresión exacta del término de acoplamiento QM-MM, el cual se puede expresar de manera genérica mediante la siguiente expresión:

$$E_{QM-MM}(I, O) = E_{QM/MM}^{bond} + E_{QM/MM}^{VdW} + E_{QM/MM}^{elect} \quad (22)$$

donde $E_{QM/MM}^{bond}$ es para tener en cuenta los enlaces que se puedan romper en la frontera, $E_{QM/MM}^{VdW}$ corresponde a la energía de interacción de Van der Waals entre ambas regiones del sistema y $E_{QM/MM}^{elect}$ corresponde a la energía de interacción electrostática entre ambas regiones. Es importante notar que independientemente del esquema QM/MM utilizado (sustractivo o aditivo), tanto $E_{QM/MM}^{bond}$ como $E_{QM/MM}^{VdW}$ son tratados a nivel MM. Además, otras interacciones enlazantes que pudieran existir entre ambos subsistemas, tales como estiramiento de enlaces, modificación de ángulos o modificación de ángulos diedros, también se tratarían a nivel MM mediante los parámetros estándar del *force field* o incluso mediante parámetros adicionales generados para ese fin.

Por otra parte, el acoplamiento electrostático entre la densidad de carga de la región QM y el modelo de cargas de la región MM se puede tratar a diferentes niveles de complejidad. Es preciso destacar que este acoplamiento o *embedding* se caracteriza por la polarización mutua que ambos subsistemas se ejercen entre sí recíprocamente. Según como se describa esta polarización mutua, este acoplamiento se puede clasificar en *embedding* mecánico, electrostático o polarizado^{228,229}. En el esquema de *embedding* mecánico, las interacciones electrostáticas QM-MM se tratan al mismo nivel que las interacciones electrostáticas MM-MM, es decir, aplicando el modelo de cargas puntuales del método MM a la región QM. Este método es conceptualmente muy simple y computacionalmente muy eficiente, pero presenta desventajas y limitaciones importantes: 1) la densidad de carga QM no se polariza por su entorno electrostático; 2) cuando la densidad de carga de la región QM cambia, tal y como sucede en las reacciones químicas, existen problemas asociados a la PES; 3) la derivación de las cargas MM para la región QM acostumbra a generar problemas.

El esquema de *embedding* electrostático subsana todos estos inconvenientes mediante cálculos QM que tienen en cuenta la presencia de las cargas MM, es decir, incorporan estas cargas puntuales como términos monoeléctricos en el hamiltoniano QM:

$$\hat{H}_{QM-MM}^{elect} = - \sum_i^N \sum_{J \in O}^L \frac{q_J}{|\vec{r}_i - \vec{R}_J|} + \sum_{a \in I+L}^M \sum_{J \in O}^L \frac{q_J Q_a}{|\vec{R}_a - \vec{R}_J|} \quad (23)$$

donde q_J hace referencia a las cargas puntuales MM que se encuentran en \vec{R}_J , Q_a hace referencia a las cargas nucleares QM que se encuentran en \vec{R}_a y \vec{r}_i designa la posición de los electrones. Los índices i , J y a se extienden a los N electrones, las L cargas puntuales y los M núcleos QM, respectivamente. Es importante notar que los dos términos de la ecuación 23 se añadirían a los de la ecuación 14 cuando se realiza el cálculo a nivel QM del subsistema interno donde el primer término de la ecuación 23 es para tener en cuenta la polarización de los electrones de la región QM por parte de las cargas clásicas MM, mientras que el segundo término de dicha ecuación es para tener en cuenta la interacción de los núcleos de la parte QM con las cargas clásicas MM. Por lo tanto, en el esquema de *embedding* electrostático la estructura electrónica de la región QM es polarizada por su entorno y puede adaptarse a cambios que ocurran en éste. Además, las interacciones electrostáticas QM-MM se tratan a nivel QM, asegurando una descripción más fidedigna de éstas, pero necesitando una potencia computacional mayor. Este esquema es el más empleado en aplicaciones biomoleculares y ha sido el empleado en la presente tesis.

En último lugar, el esquema de *embedding* polarizado considera un modelo de cargas MM variable que es polarizado por la distribución de cargas QM. Dentro de este esquema, existen dos posibles alternativas: 1) un modelo de cargas polarizable en la región MM el cual es polarizado por el campo eléctrico de la región QM pero dicho campo no actúa sobre la densidad de carga QM; 2) una formulación autoconsistente que incluye el modelo polarizable MM en el hamiltoniano QM, permitiendo una polarización mutua.

Finalmente, es necesario subrayar que una descripción exacta de las fuerzas electrostáticas que provienen del subsistema interno y la inclusión de todas las contribuciones electrostáticas es esencial para modelizar de manera realista los sistemas biomoleculares^{230,231}.

2.1.5.3 La frontera QM-MM

En relación con la localización de la frontera QM-MM, la situación ideal es que dicha frontera separe los subsistemas QM y MM de manera que la frontera no corte ningún enlace covalente, ya que esto simplificaría enormemente tanto el tratamiento de la frontera en sí como el acoplamiento entre ambos subsistemas. Sin embargo, en la mayoría de casos es inevitable que la frontera QM-MM corte algunos enlaces covalentes. En la Figura 20 aparece una representación esquemática de una frontera QM-MM que corta un enlace covalente donde los átomos QM y MM que compartían el enlace que ha sido cortado están designados como Q^1 y M^1 , respectivamente, y reciben el nombre de átomos de frontera o límite. La primer capa MM, es decir, los átomos MM que están directamente enlazados a M^1 se etiquetan como M^2 , de igual manera, la segunda capa MM, es decir,

los átomos MM que están a dos enlaces de distancia de M^1 se etiquetan como M^3 y etcétera. Similarmente se etiquetan los átomos QM, aunque estos vienen designados por Q. En general, se deben tomar tres consideraciones en cuenta cuando se cortan enlaces covalentes con la frontera QM-MM: 1) los enlaces cortados deben estar saturados en la región QM ya que dicha región no puede estar truncada, es decir, estos enlaces cortados no se pueden tratar como si se hubieran roto de manera homolítica o heterolítica; 2) para el *embedding* electrónico o polarizado, se tiene que evitar la sobrepolarización de la densidad electrónica QM por parte de las cargas MM que se encuentren cerca de la frontera QM-MM, sobre todo si se utiliza el esquema de los *link atoms*; 3) en relación con los términos MM enlazantes, se debe evitar contar por duplicado las interacciones que involucren átomos de los dos subsistemas.

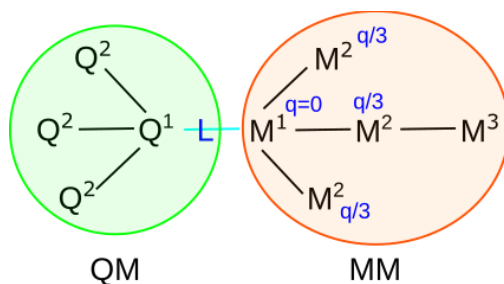


Figura 20. Representación esquemática de una frontera QM-MM que corta un enlace covalente (indicado con una línea azul claro) y se ha tratado de acuerdo al esquema de los *link atoms* donde el *link atom* añadido está indicado con L en azul oscuro. Dicha representación también muestra un esquema de desplazamiento de carga donde la carga MM original q es suprimida de M^1 y es redistribuida eventualmente entre los átomos M^2 . Además, se colocan pares de cargas en las cercanías de los átomos M^3 para restaurar el dipolo M^1 - M^2 original (no mostrado en la figura).

Existen dos esquemas principales para tratar la frontera QM-MM cuyo objetivo es proporcionar una descripción equilibrada de las interacciones QM-MM en el límite de los subsistemas: 1) el esquema de los *link atoms* que capa las valencias libres de la región QM generadas por el corte de enlaces covalentes mediante la adición de centros atómicos L , que normalmente son un átomo de hidrógeno, que no pertenecen al sistema real y se unen de manera covalente a los átomos QM que han quedado con alguna valencia libre; 2) esquemas de orbitales localizados que colocan orbitales híbridos sobre la frontera, saturando los enlaces cortados de la región QM.

Como norma general, la frontera QM-MM se debe colocar tan distante como sea posible de la región reactiva, aunque esto aumente el coste computacional. Por otra parte, los átomos QM que participen en la rotura y formación de enlaces no deben estar implicados en los términos de acoplamiento enlazantes, de manera que como los términos asociados a diedros se extienden más de dos enlaces en la región interna, estos átomos se deben encontrar a por lo menos tres enlaces de la frontera QM-MM. Además, los enlaces truncados no deben de ser ni polares ni estar involucrados en interacciones conjugadas, así que los enlaces alifáticos C-C y los enlaces amida son una buena opción para colocar la frontera.

2.1.5.3.1 Esquema de los *link atoms*

Como se ha introducido en la sección anterior, el esquema de los *link atoms* satura las valencias libres originadas en la frontera QM-MM mediante átomos adicionales, que acostumbran a ser átomos de hidrogeno, covalentemente unidos a los átomos QM que portan dichas valencias (ver Figura 20). Entonces, los cálculos QM se realizan en un sistema electrónicamente saturado que está constituido por la suma del subsistema interno y de los *link atoms*, es decir, $I+L$. Además, los enlaces covalentes que han sido cortados por la frontera QM-MM se tratan a nivel MM. Vale la pena mencionar que el uso del esquema de los *link atoms* está enormemente extendido debido principalmente a su simplicidad y fácil implementación, aunque existen algunos problemas asociados con la introducción de centros atómicos adicionales: 1) adición de grados de libertad adicionales asociados con los *link atoms* introducidos; 2) sobrepolarización de la densidad de carga QM en los esquemas de *embedding* electrostático o polarizado como consecuencia de que los *link atoms* están próximos a los átomos MM que hacen frontera (como norma general a 0.5 \AA); 3) los *link atoms* no son equivalentes ni químicamente ni electrónicamente a los grupos que sustituyen.

A pesar de los problemas comentados, el esquema de los *link atoms* es ampliamente aceptado y se han desarrollado bastantes esquemas que se basan en éste²²⁴. Por un lado, los grados de libertad adicionales se pueden eliminar mediante el uso de restricciones²³², es decir, expresando la posición de los *link atoms* en función de las posiciones de los átomos Q^1 y M^1 correspondientes (el *link atom* L se coloca a lo largo del enlace Q^1-M^1 y Q^1-L está relacionado con Q^1-M^1 mediante un factor de escala). Por otro lado, siempre existe cierto grado de sobrepolarización cuando una sola carga puntual interactúa con una distribución de carga polarizable y esto se incrementa al reducir la distancia entre la carga puntual y la densidad de carga QM y al aumentar la flexibilidad de la densidad de carga QM. Este problema acostumbra a atenuarse cuando se emplean conjuntos de base pequeños en los átomos de la región QM. Existen diferentes métodos para reducir la sobrepolarización en el contexto de los *link atoms*: 1) eliminar las integrales monoelectrónicas asociadas a los *link atoms*; 2) eliminar las cargas puntuales MM que se encuentren en la región de frontera del hamiltoniano; 3) redistribuir/desplazar las cargas puntuales que se encuentren en la región de frontera (Figura 20). Los esquemas de este tipo, es decir, que preservan carga y a menudo dipolos en la región de frontera, eliminan la sobrepolarización y superan las principales deficiencias de los esquemas que eliminan totalmente la carga. De hecho, los esquemas de desplazamiento de carga son ampliamente utilizados y en la presente tesis se ha utilizado uno de ellos²³³⁻²³⁵; 4) Atenuar las cargas puntuales cercanas a la región QM mediante su sustitución por distribuciones de carga (funciones Gaussianas).

Para concluir, aunque los enfoques basados en orbitales híbridos²³⁶⁻²³⁹ son más profundos desde un punto de vista teórico, ya que éstos proporcionan una descripción a nivel QM de la frontera QM-MM, éstos son más difíciles de implementar y requieren cálculos previos del sistema que como norma general no son transferibles entre sistemas similares. De hecho, estos inconvenientes han sido los que han motivado el uso del esquema de los *link atoms*.

2.1.6 Cálculos de energía de Gibbs

En procesos a temperatura y presión constantes, la energía de Gibbs indica tanto la espontaneidad como la fuerza motriz del proceso considerado. Como se ha ido comentando a lo largo de la tesis, debido a que en los procesos químicos se forman y rompen enlaces, es decir, cambia la estructura electrónica del sistema, es necesario emplear la teoría QM para el cálculo de las barreras de energía de Gibbs. Cálculos sobre la PES proporcionan la energía interna del sistema a cero Kelvin (sin tener en cuenta la energía vibracional de punto cero) y la energía libre de Helmholtz A de éste vendría dada por la siguiente expresión:

$$A = -k_B T \ln Q \quad (24)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura y Q es la función de partición canónica, es decir, la correspondiente al colectivo NVT. Es importante notar que para el colectivo NPT se obtiene la energía de Gibbs directamente y que los sistemas en fase condensada exhiben valores muy similares de ΔA y ΔG . Por otra parte, los cálculos de incrementos de energía de Gibbs a lo largo de la coordenada de reacción ξ , un parámetro geométrico que describe el grado de progresión de una reacción química y que lleva de manera monótona de reactivos a productos, permiten el cálculo de las barreras de energía de Gibbs ΔG para procesos químicos. Para tener en cuenta las contribuciones térmicas y entrópicas, este tipo de cálculos necesita la exploración conformacional del sistema sobre sus grados de libertad con la excepción del que corresponde ξ , la cual se lleva a cabo mediante una simulación de MD. En la práctica, en vez de calcular la función de partición, lo que se calcula es la densidad de probabilidad $P(\xi)$. Así pues, el potencial de fuerza media (PMF) que corresponde a la energía de Gibbs a lo largo de la coordenada de reacción se calcula aplicando la siguiente expresión:

$$W(\xi) = -k_B T \ln P(\xi) \quad (25)$$

Cabe destacar que la principal dificultad para calcular PMF es la exploración conformacional de las regiones de alta energía, es decir, aquéllas que se encuentren próximas a los TSs, ya que dicha exploración acostumbra a ser pobre. Hay dos métodos principales para superar este inconveniente: 1) *Free Energy Perturbation* (FEP)²⁴⁰; 2) *Umbrella Sampling* (US)^{241,242}.

Sólo se va a desarrollar US, ya que ha sido el método empleado en esta tesis.

2.1.6.1 *Umbrella Sampling*

La idea subyacente a este método es añadir un potencial sesgado con el objetivo de restringir al sistema a una región determinada del espacio de configuraciones, permitiendo a la simulación de MD explorar configuracionalmente regiones de alta energía que con una simulación de MD convencional nunca serían exploradas. Esto es de especial utilidad cuando se realizan cálculos sobre una coordenada de reacción para calcular el perfil de energía potencial y explorar configuracionalmente regiones cercanas al TS, las cuales

apenas serían exploradas debido a su alta energía. Este perfil se calcula a partir de una serie de cálculos sesgados, que reciben el nombre de ventanas, donde cada uno de ellos se realiza en un valor dado de la coordenada de reacción tal y como ejemplifica la siguiente ecuación:

$$E^b(\vec{r}) = E^u(\vec{r}) + \omega_i(\xi) \quad (26)$$

donde $E^b(\vec{r})$ corresponde a la energía del sistema sesgada en un punto del espacio de configuraciones \vec{r} dado, $E^u(\vec{r})$ corresponde a la energía del sistema real en un punto del espacio de configuraciones \vec{r} dado y $\omega_i(\xi)$ corresponde al potencial añadido que sesga la energía del sistema. Dicho potencial para sesgar los cálculos acostumbra a ser un potencial armónico, el cual restringe el cálculo en cada ventana particular i a un valor de referencia de la coordenada de reacción dado, que se expresa como ξ_i^{ref} :

$$\omega_i(\xi) = \frac{k}{2} (\xi - \xi_i^{ref})^2 \quad (27)$$

es importante notar que el potencial añadido para sesgar la energía $\omega_i(\xi)$ únicamente depende de la coordenada de reacción. Entonces, de cada una de estas ventanas se obtiene una distribución de probabilidad sesgada y para calcular el perfil de energía de Gibbs sin sesgo se aplica uno de los métodos desarrollados para analizar US.

Desde un punto de vista práctico, para una coordenada de reacción dada, primero de todo se construye el perfil de energía potencial y las diferentes estructuras obtenidas a lo largo de la coordenada de reacción se utilizan como puntos de partida de los cálculos de US, es decir, de las ventanas. Entonces, en el caso de que se necesite emplear el formalismo QM/MM como pasa en los procesos químicos, se calcula una simulación de MD a nivel QM/MM en cada ventana aplicando el correspondiente potencial que restringe el grado de libertad del sistema asociado a la coordenada de reacción al valor el cual la ventana está fijada, mientras que el resto de grados de libertad del sistema pueden explorar el espacio configuracional sin ningún sesgo. Posteriormente, se obtiene para cada ventana la distribución de probabilidad sin sesgar a partir de la distribución sesgada. En último lugar, se combinan las distribuciones de probabilidad sin sesgar de todas las ventanas para obtener el perfil de energía de Gibbs. Es importante notar que existen diversos métodos para calcular el perfil de energía de Gibbs, aunque el más extendido es *Weight Histogram Analysis Method* (WHAM)²⁴³, el cual ha sido el empleado en esta tesis.

Parte III

Objetivos

Capítulo 3

Objetivos

Dado que la temática de la presente tesis es muy amplia y variada, ya que se tratan dos familias de enzimas diferenciadas como son las LOXs y las COXs y, además, distintas isoformas de la primera de las dos familias mencionadas (5-LOX y 15-LOX-1) con diferentes propósitos, ésta tiene diversos objetivos los cuales distan bastante entre sí.

En primer lugar, se pretende alcanzar una comprensión profunda del mecanismo de reacción de las LOXs, haciendo especial énfasis en los factores sutiles que controlan su estricta especificidad de reacción. En relación con la 15-LOX-1, se han considerado 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y 5(*S*),15(*S*)-diHETE como sustratos, mientras que respecto a la 5-LOX se ha considerado únicamente el AA, el cual es el principal sustrato de las LOXs de mamífero y por consiguiente de las LOXs humanas. La comprensión de dichos factores que regulan la especificidad de reacción, es decir, la regioespecificidad y la estereoespecificidad de las LOXs, es crucial en el diseño de estrategias para alterar la función de estas enzimas con el objetivo de convertir su actividad inflamatoria normal, la cual está involucrada en muchas enfermedades, en una actividad antiinflamatoria. Una posible estrategia para lograrlo es el uso de inhibidores, pero el diseño de tales compuestos requiere un conocimiento exhaustivo de la reactividad y mecanismo de sus receptores diana. Es importante subrayar que las diferentes isoformas de las LOXs a partir de un sustrato común pueden originar distintos productos con diferentes, e incluso opuestas, funciones biológicas. Dicha característica de estas enzimas ha causado que averiguar cómo las distintas isoformas de las LOXs pueden llevar a cabo reacciones tan diferentes y, por consiguiente, originar productos tan diversos, sea un tema candente de investigación. Una parte del trabajo presentado en esta tesis tiene el objetivo de clarificar lo que se acaba de exponer a nivel molecular, lo cual es un paso previo necesario al diseño racional de inhibidores específicos de cada isoforma de las LOXs. Como ya se ha introducido anteriormente, dicho trabajo se ha centrado exclusivamente en la 15-LOX-1 de conejo y en la h-5-LOX. El tratamiento teórico de tales sistemas complejos requiere el uso de

diferentes métodos computacionales. En relación con éstos, se utilizarán cálculos de *docking* para generar los diferentes modos de unión del sustrato dentro de la cavidad de las LOXs consideradas. A continuación, se realizarán simulaciones de MD para producir las diferentes conformaciones de los distintos complejos de Michaelis enzima-sustrato totalmente solvatados, cosa que permitirá evaluar su estabilidad. Posteriormente, se llevarán a cabo cálculos QM/MM para estudiar el mecanismo de reacción de las LOXs consideradas, tratando la región QM a nivel DFT para obtener una descripción fiable de la evolución de la estructura electrónica a lo largo de dicho mecanismo.

En segundo lugar, se intentará desarrollar un método alternativo para calcular la barrera de energía de Gibbs a partir de barreras de energía potencial aprovechando el desorden instantáneo que presentan los sistemas complejos. La motivación de dicho desarrollo es que los métodos convencionales de cálculo de energía de Gibbs acostumbran a ser muy costosos computacionalmente y bastante incompletos, cosa que origina que sean difícilmente aplicables en sistemas de cierta complejidad dado que la exploración conformacional que se puede alcanzar alrededor de las estructuras generadas mediante el cálculo de perfiles de energía potencial para estos sistemas es insuficiente. Debido a la temática de la presente tesis, los sistemas que se van a escoger para poner en práctica este método alternativo son diferentes complejos de Michaelis enzima-sustrato. Este trabajo no será realizado en solitario y nuestra contribución a éste será el estudio de las abstracciones de hidrógeno $H_{7\text{proS}}$ y $H_{13\text{proS}}$ del AA catalizadas por la 15-LOX-1 de conejo. El desorden instantáneo para el complejo de Michaelis 15-LOX-1-AA se generará mediante una simulación de MD y el estudio de las abstracciones de hidrógeno comentadas se llevará a cabo a partir de cálculos QM/MM tratando a nivel DFT la región del sistema donde haya cambios en la estructura electrónica.

En tercer lugar, se procurará comprender las propiedades alostéricas del dímero de 15-LOX-1 de mamífero dado que tanto las estructuras cristalográficas como recientes experimentos realizados sugieren que las LOXs en solución acuosa se encuentran en un equilibrio monómero-dímero. Dicha tarea se llevará a cabo en colaboración con un grupo experimental donde los resultados obtenidos por ambas partes se irán poniendo en común periódicamente. Nuestra contribución consistirá en estudiar *in silico* el dímero de 15-LOX-1 de conejo y algunos de sus posibles mutantes con distintos sustratos, los cuales se encontrarían unidos en la cavidad del monómero B del modelo dimérico correspondiente, e inhibidores, los cuales se encontrarían unidos en la cavidad del monómero A del modelo dimérico correspondiente. Con este estudio se pretende entender los siguientes fenómenos alostéricos que exhibe la 15-LOX-1 de mamífero: 1) heterogeneidad conformacional y efectos cooperativos; 2) papel de la Gln596 en la especificidad, la estabilidad proteica y las propiedades alostéricas; 3) mecanismo de acción de los inhibidores alostéricos de la actividad oxigenasa del LA *N-Substituted 5-(1H-Indol-2-yl)-2-methoxyanilines*. El modo de unión de los diferentes sustratos e inhibidores considerados al modelo dimérico correspondiente se generará mediante cálculos de *docking*, mientras que la exploración conformacional de los diferentes complejos de Michaelis barajados, la cual permite el estudio de las diferentes propiedades alostéricas, se llevará a cabo por medio de simulaciones de MD.

En último lugar, se intentará diseñar de manera racional inhibidores específicos de la COX-2 que incorporen un fotointerruptor tipo azobenceno con la intención de que éstos

no exhiban los potentes efectos secundarios típicos de los COXIBs, pero conservando la actividad antiinflamatoria típica de este tipo de fármacos. El modo de unión de los diferentes inhibidores específicos diseñados dentro del centro activo COX de la COX-2 se generará mediante cálculos de *docking*, mientras que la estabilidad de los distintos complejos de Michaelis COX-2-inhibidor obtenidos se evaluará mediante simulaciones de MD de dichos complejos.

Parte IV

Resultados y Discusión

Capítulo 4

Detalles moleculares del mecanismo de formación de lipoxinas en la ruta biosintética de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE catalizada por la 15-LOX-1 de reticulocito

Los resultados presentados a lo largo del capítulo 4 han sido publicados en el siguiente artículo:

Journal of Physical Chemistry B, vol. 124, pp. 11406-11418, 2020

4.1 Introducción

Durante estos últimos años, la 15-LOX-1 de reticulocito ha sido una de las lipoxigenasas de mamífero más ampliamente estudiada. Como ya se ha comentado previamente, no se dispone de la estructura cristalográfica de la 15-LOX-1 humana, sin embargo, sí que se dispone de dicha estructura para la 15-LOX-1 de conejo, la cual va a servir de modelo para la humana, ya que la 15-LOX-1 de conejo comparte un 80% de identidad de secuencia con la humana^{29,36,37}.

Debido a que las lipoxinas (LXs) son SPMs que están implicados en la fase de resolución de la inflamación, se han estudiado extensamente sus diferentes rutas biosintéticas²⁴⁴, las cuales presentan una gran complejidad, ya que las células pueden emplear diferentes rutas para producir LXs en función de las isoenzimas de LOXs y sustratos disponibles. Además,

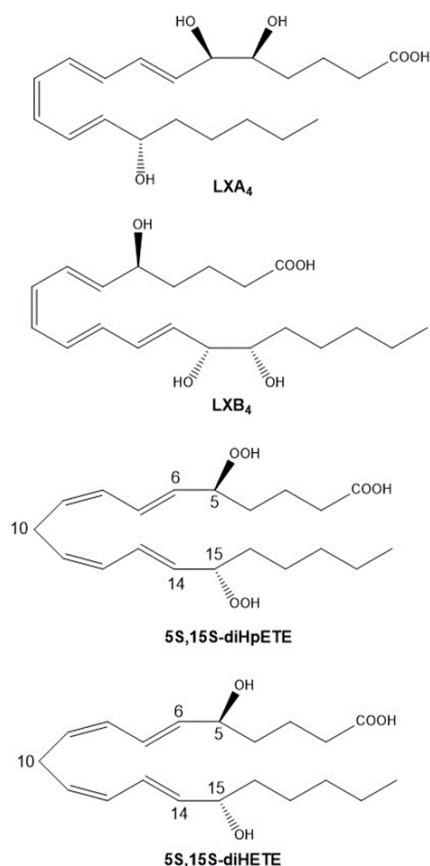


Figura 21. Estructuras correspondientes a LXA₄, LXB₄, 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y 5(*S*),15(*S*)-diHETE (de arriba a abajo).

no se acaban de comprender los detalles moleculares de los mecanismos de estas rutas. Una de las rutas biosintéticas más importantes involucra al ácido 5(*S*),15(*S*)-dihidroperoxieicosatetranoico (5(*S*),15(*S*)-diHpETE) que es un intermedio identificado en una gran variedad de muestras biológicas (Figura 21). Dicho intermedio se produce mediante dos hidropoxidaciones sucesivas del AA las cuales son catalizadas por las enzimas 15-LOX-1 y 5-LOX. Holman y sus colaboradores²⁴⁴ han determinado experimentalmente que la 15-LOX-1 de reticulocito humana es 20 veces más eficiente que la 12-LOX plaquetaria humana respecto a la catálisis de la producción de LXB₄ a partir de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE, cosa que es sorprendente, ya que esta catálisis se inicia mediante la abstracción de un átomo de hidrógeno del C₁₀ del 5(*S*),15(*S*)-diHpETE por parte del cofactor Fe(III)-OH⁻ de la enzima correspondiente y dicha posición de abstracción de hidrógeno es la preferida de la 12-LOX, no de la 15-LOX-1. Además, tres aspectos interesantes relacionados con la catálisis de 15-LOX-1 permanecen sin resolver: 1) tras la abstracción de hidrógeno del C₁₀, existen dos posibles mecanismos competitivos que podrían conducir a la formación de LXs. El primero, que recibiría el nombre de deshidratación o epoxidación, consiste en la formación del 5,6-epóxido o del 14,15-epóxido seguido por la apertura del correspondiente epóxido catalizada por una hidrolasa, conduciendo a LXA₄ o LXB₄, respectivamente (ver Figura 21). El segundo, que recibiría el nombre de oxigenación, involucra la adición de una molécula de oxígeno al C₆ o al C₁₄, la formación del hidroperóxido correspondiente y la reducción a LXA₄ o LXB₄ por medio

de la catálisis de una reductasa. Los resultados experimentales de Holman y sus colaboradores²⁴⁴, sugieren que no existe preferencia alguna por ninguno de estos dos mecanismos. Sin embargo, es preciso destacar que aunque se ha probado la presencia de hidroperóxidos, ningún epóxido ha sido detectado de manera directa. Además, Kühn *et al.*²⁴⁵ habían mostrado previamente que se podía formar LXB₄ mediante la oxigenación de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE catalizada por la 15-LOX-1 de reticulocito de conejo sin la formación de un epóxido; 2) la 15-LOX-1 produce únicamente LXB₄ a partir de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE²⁴⁴, pero no LXA₄; 3) la 15-LOX-1 no es capaz de catalizar ninguna reacción de oxigenación del ácido 5(*S*),15(*S*)-dihidroieicosatetranoico (5(*S*),15(*S*)-diHETE) (Figura 21), el cual es la forma reducida del 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y no puede formar epóxidos. Este capítulo 4 tiene la intención de profundizar en la comprensión a nivel molecular de los mecanismos de formación de lipoxinas mediante la ruta biosintética que involucra al 5(*S*),15(*S*)-diHpETE. Con el objetivo de conseguir esto, se han combinado simulaciones de MD con cálculos QM/MM para explorar las diferentes reacciones que la 15-LOX-1 de reticulocito es capaz de catalizar cuando 5(*S*),15(*S*)-diHpETE o 5(*S*),15(*S*)-diHETE actúan como sustrato. Los resultados obtenidos pueden ser útiles para comprender mejor como se sintetizan los SPMs de manera biológica.

4.2 Metodología

En relación con la enzima, la 15-LOX-1 humana se ha modelizado a partir de la estructura cristalográfica del dímero de la 15-LOX-1 de conejo (*PDB code*: 2P0M)³⁷. Dicha estructura se ha procesado de manera que se ha eliminado su monómero A y el ligando que se encuentra unido en el centro activo del monómero B. Además, se ha asignado el estado de protonación a la estructura resultante mediante el servidor web H++^{246,247} donde se ha empleado un pH de 6.5 para los residuos titulables. Sin embargo, el estado de protonación correspondiente a la esfera de coordinación del átomo de hierro se ha asignado manualmente para asegurar una correcta descripción de éste.

Se ha utilizado el programa GOLD5.2.2²⁴⁸ para realizar cálculos de *docking* de 5(*S*),15(*S*)-diHETE y 5(*S*),15(*S*)-diHpETE dentro de la cavidad del monómero B que ha resultado del procedimiento anterior. Durante la exploración conformacional se ha considerado a la enzima como un receptor rígido, mientras que el ligando disponía de flexibilidad completa. Se activó la opción del programa GOLD para tener en cuenta las interacciones de ligandos orgánicos con iones metálicos en metaloenzimas, aunque el átomo de hierro se restringió a geometrías hexaédricas en la exploración de los cálculos de *docking*. Por otra parte, se empleó el algoritmo genético para realizar la exploración conformacional de ambos sustratos y el lugar de unión del sustrato se definió como una esfera de 20 Å de radio centrada en el átomo de hierro. Se realizó una estimación de las energías de Gibbs de unión mediante la función de *fitness* ChemScore.

Se seleccionaron las dos mejores poses de cada ligando para iniciar una simulación de MD con cada una de ellas. Para montar los diferentes sistemas se empleó el procedimiento recomendado por el paquete de programas de AMBER²⁴⁹. Para los átomos correspondientes a la enzima se utilizó el *force field* ff14SB²⁵⁰, mientras que para ambos ligandos se desarrollaron parámetros específicos. A la hora de realizar los cálculos

necesarios para generar dichos parámetros específicos, se siguió el protocolo estándar de AMBER con los módulos Antechamber y Parmchk2 donde se usó la librería GAFF2^{249,251} como fuente para estos parámetros. Se optimizaron las estructuras de los sustratos empleando el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) y mediante el procedimiento RESP de Merz y Kollman²⁵² se han asignado las cargas atómicas de estos sustratos. Además, con el objetivo de asegurar que el estado de protonación de ambos sustratos coincide con su estado de protonación en condiciones fisiológicas, éste se estableció de manera manual en ambos casos. Se han desarrollado parámetros MM específicos para el átomo de hierro y su primera esfera de coordinación (His361, His366, His541, His545, Ile663 y el grupo OH⁻)³⁸ usando para los cálculos de constantes de fuerzas el procedimiento MCPB.py²⁵³ dentro del modelo *bonded* y el método de Seminario²⁵⁴. Después de combinar los archivos correspondientes de enzima y sustrato, se usó el programa tLeap para solvatar los diferentes complejos proteína-sustrato con una caja ortorrómbica de aguas TIP3P²⁵⁵ preequilibradas y para neutralizar su carga total añadiendo cationes sodio. Los sistemas resultantes contienen alrededor de 86500 átomos, de los cuales unos 10600 pertenecen a la proteína, mientras que el resto corresponden a moléculas de agua y cationes sodio. Se han calculado todas las simulaciones de MD usando el mismo protocolo con la versión AMBER 16 GPU (CUDA) del paquete PMEMD^{214,256}. Inicialmente, se sometió a los sistemas a 22000 pasos de minimización de energía combinando los métodos *steepest descent* y *conjugate gradient* para eliminar los malos contactos. En los primeros 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos de proteína y sustrato con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻², de manera que sólo se relajaba el solvente y los iones. En los siguientes 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas únicamente a los átomos del esqueleto proteico y a los átomos pesados del sustrato con la misma constante de fuerza que antes. Sin embargo, en los últimos 10000 pasos se dio total libertad a todo el sistema. Posteriormente, se calcularon las simulaciones de MD usando condiciones periódicas de frontera. Se calentaron los sistemas de manera gradual de 0 K a 300 K a lo largo de un período de 200 ps. El siguiente paso consistió en ajustar el volumen de la caja ortorrómbica de manera que la densidad de ésta fuera aproximadamente 1 g cm⁻³ mediante una simulación de MD de 1 ns dentro del colectivo NTP (300 K, 1 bar). Durante el calentamiento y la etapa isobárica del sistema se aplicaron restricciones armónicas a los átomos del esqueleto proteico y a los átomos pesados del sustrato con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻², mientras que al resto del sistema no se le aplicó ninguna restricción. Se controló la temperatura mediante dinámica de Langevin²¹⁶, mientras que la presión se ajustó mediante el baróstato de Berendsen²¹⁷. A continuación, se realizó una etapa de equilibración de 10 ns a temperatura (300 K) y volumen constantes. En último lugar, se calculó un período de producción de una longitud de 100 ns dentro del colectivo NVT. A lo largo de toda la trayectoria de MD se ha usado un *time step* de 2 fs. Se han calculado las interacciones no enlazantes empleando un *cutoff* de 9 Å y se ha realizado el análisis de las simulaciones de MD con AmberTools18²⁴⁹.

Por otra parte, se realizaron los cálculos QM/MM utilizando el paquete de programas modular ChemShell^{234,257}. Para los cálculos DFT se usó TURBOMOLE²⁵⁸, mientras que para los cálculos MM se usó el módulo DL_POLY²⁵⁹ de ChemShell empleando el *force field* de AMBER. Para tratar las interacciones electrostáticas entre los subsistemas QM y MM se empleó un esquema de *embedding* electrónico²²⁸. Además, se adoptó un esquema

de *link atoms* para describir la frontera QM-MM usando un modelo de desplazamiento de carga²³⁵ y no se emplearon *cutoffs* para tratar las interacciones no enlazantes MM y QM/MM²⁶⁰. Se han realizado las optimizaciones QM/MM empleando el algoritmo *limited-memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno* (L-BFGS)^{261,262} para las minimizaciones de energía. En relación con las búsquedas de los TSs, se emplearon el *dimer method*^{263,264} junto con el método L-BFGS para las abstracciones de hidrógeno y la retrodonación de hidrógeno, mientras que para las oxigenaciones se usó el *partitioned rational function optimizer* (P-RFO)^{265,266} combinado con el algoritmo L-BFGS. Todos estos algoritmos están implementados en la librería DL_FIND de optimización de geometrías de ChemShell²⁶⁷, con la excepción de P-RFO que está implementado en el módulo HDLCopt (*hybrid delocalized internal coordinate scheme*) de ChemShell²⁶⁸. La naturaleza de las estructuras de los TSs se ha confirmado mediante el análisis del número de frecuencias imaginarias (únicamente una para las estructuras de TS). Se seleccionaron algunas estructuras que eran adecuadas para experimentar abstracciones de hidrógeno u oxigenaciones de las simulaciones de MD previas para realizar los cálculos QM/MM. Para cada estructura seleccionada, se eliminaron todas las moléculas de agua que se encontraban fuera de un volumen de 17 Å de radio centrado en la molécula de sustrato. La región activa se definió como todos los residuos y moléculas de agua que se encuentren dentro de una esfera de 15 Å de radio centrada en el C₁₀ del ligando. A esta región, que contenía alrededor de 2100 átomos, se le permitió moverse libremente, mientras que el resto de átomos permanecieron fijos. En cada cálculo QM/MM se tuvieron en cuenta aproximadamente 12000 átomos. La región QM se describió mediante el funcional híbrido B3LYP²⁶⁹. Para los átomos C, H, O y N se empleó el conjunto de base de People 6-31G(d), mientras que para el átomo de Fe se utilizó el conjunto de base LANL2DZ²⁷⁰. Éste último es un conjunto de base relativamente reducido que combina un *effective core potential* (ECP) con un conjunto de base de valencia de calidad doble zeta. Como norma general, este conjunto de base debe ser usado con precaución, pero se ha comprobado que se puede emplear para describir el átomo de Fe en muchas reacciones de lipoxigenasas con resultados aceptables²⁷¹⁻²⁷⁴. Con respecto a las abstracciones de hidrógeno y las formaciones de epóxidos, se definió la región QM (ver Figura 22) como todos los átomos del sustrato lipídico que se encuentran entre C₄ y C₁₆, 11 átomos por cada His de la esfera de coordinación del átomo de hierro (His361, His366, His541 y His545), 3 átomos de la Ile terminal (Ile663) de la esfera de coordinación del átomo de hierro y el cofactor Fe(III)-OH, mientras que para las oxigenaciones y la retrodonación de hidrogeno, se ha extendido esta región en una molécula de oxígeno. En todos los casos se usó una multiplicidad de sextete donde la carga neta de la región QM es 1 u.a. Además, se han utilizado siete *link atoms*, cinco de los cuales entre los enlaces C_x-átomo QM de los cinco residuos de la esfera de coordinación del átomo de hierro y los dos restantes se encuentran unidos a los átomos de carbono alifáticos del sustrato lipídico (colocados entre C₄-C₅ y C₁₅-C₁₆). En la Figura 23 está representada una visión completa del complejo de Michaelis 15-LOX-1 de conejo-5(S),15(S)-diHpETE.

En último lugar, los canales a través de los cuales puede acceder el oxígeno al interior de la proteína se han buscado utilizando el programa Caver3.0²⁷⁵ y analizando las primeras 2000 estructuras de la primera simulación de MD para cada ligando. Para el cálculo de dichos canales, se han seleccionado los parámetros por defecto excepto para el radio de

prueba mínimo, que ha sido fijado a un valor de 2 Å. Todas las visualizaciones y representaciones se han realizado con los programas VMD²⁷⁶ y UCSF CHIMERA²⁷⁷.

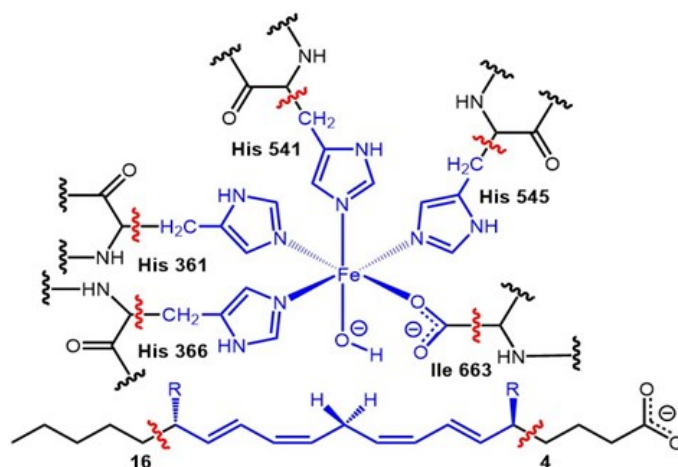


Figura 22. Partición QM/MM para la abstracción de hidrógeno y la formación del epóxido. Los átomos QM están representados en azul. La frontera entre las regiones QM y MM está indicada por líneas rojas onduladas. R es OOH para 5(*S*),15(*S*)-diHpETE o OH para 5(*S*),15(*S*)-diHETE.

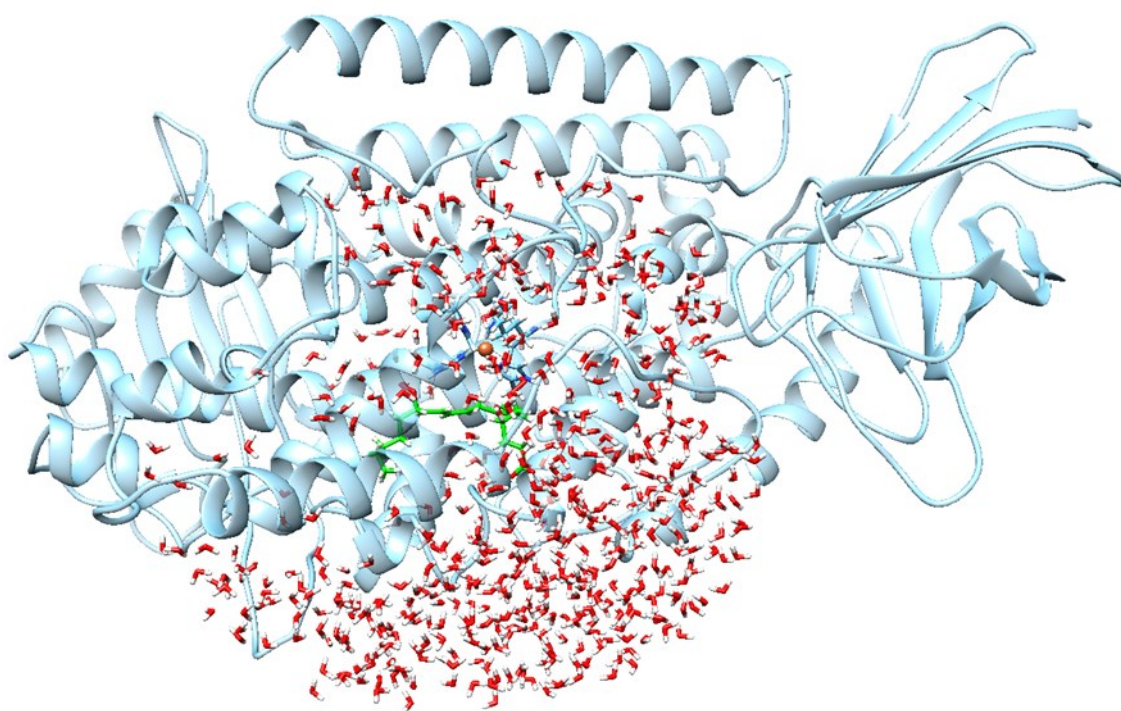


Figura 23. Vista completa del complejo de Michaelis 15-LOX-1 de conejo-5(*S*),15(*S*)-diHpETE. Los átomos de carbono del sustrato están representados en verde y los átomos de oxígeno en rojo. El átomo de Fe está indicado en naranja y los átomos de nitrógeno de las His de la esfera de coordinación del Fe están indicados en azul oscuro. Se muestran las moléculas de agua que se encuentran dentro de un volumen de 17 Å de radio centrado en la molécula de sustrato. Todos los átomos de hidrógeno están representados en blanco.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Cálculos de *docking* de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y 5(*S*),15(*S*)-diHETE

Todos los cálculos de *docking* colocan primero la cola del sustrato, esta orientación denominada *tail-first* significa que el grupo metilo entrante del AA apunta hacia el extremo final de la cavidad de la enzima. Los cálculos de *docking* de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE han producido 4 clústeres donde 2 de los cuales son los más poblados. En estos dos clústeres, el grupo carboxilato está próximo a los grupos NH del esqueleto proteico de Phe175 y Leu408. El grupo hidropéroxido que se encuentra en el C₅ del 5(*S*),15(*S*)-diHpETE forma un puente de hidrógeno con la Ile663 terminal, que se encuentra en la esfera de coordinación del Fe, que a su vez forma un puente de hidrógeno con el grupo OH del cofactor Fe(III)-OH. Además, el grupo hidropéroxido que se encuentra en el C₁₅ del 5(*S*),15(*S*)-diHpETE está cerca de His361 y forma puentes de hidrógeno con Gln548 y Glu357 (ver Figura 24).

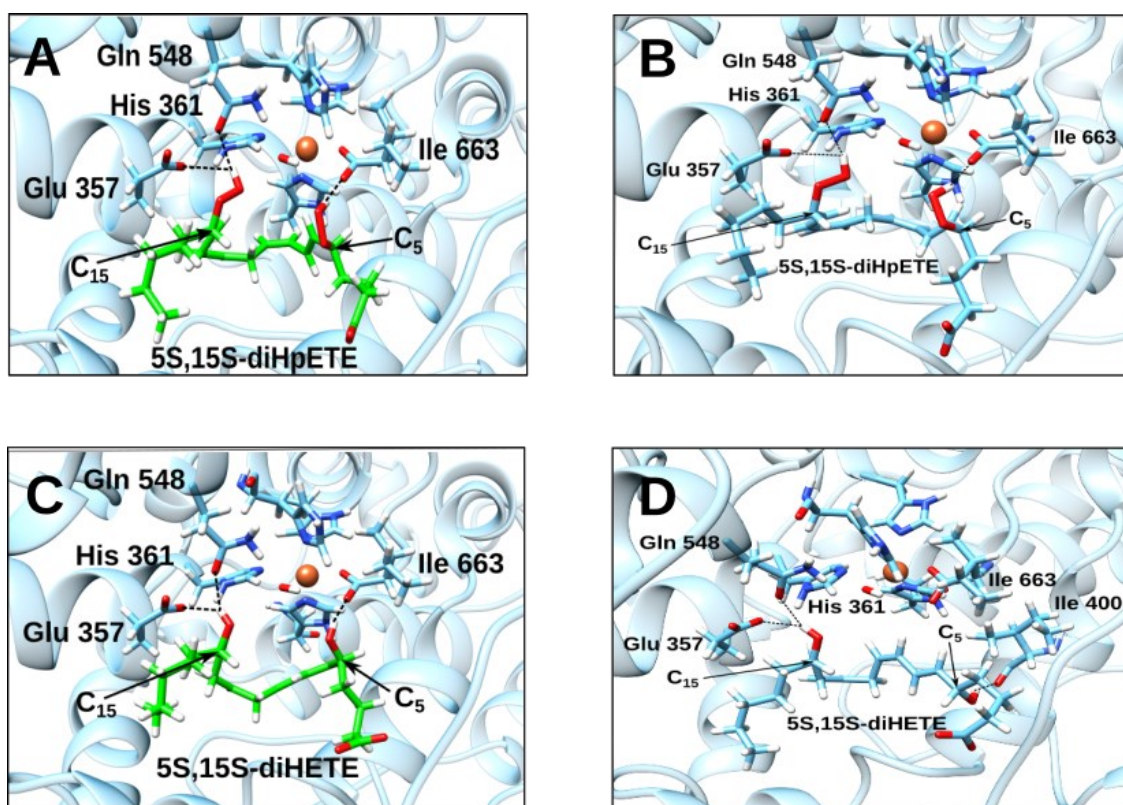


Figura 24. Estructura representativa de los dos clústeres más poblados correspondientes al *docking* de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE (panel A corresponde al más poblado y panel B corresponde al segundo más poblado) y al *docking* de 5(*S*),15(*S*)-diHETE (panel C corresponde al más poblado y panel D corresponde al segundo más poblado). Se han indicado con líneas negras discontinuas los puentes de hidrógeno que forman los grupos hidropéroxido e hidroxilo.

Los cálculos de *docking* de 5(*S*),15(*S*)-diHETE han producido 8 clústeres donde 2 de los cuales son también los más poblados. En estos dos clústeres, el grupo carboxilato se encuentra próximo a los grupos NH del esqueleto proteico de Phe175 y Leu408. El grupo hidroxilo que se encuentra en el C₅ forma un puente de hidrógeno con Ile663 o con Ile400, dependiendo del clúster escogido. Por otra parte, el grupo hidroxilo que se encuentra en el C₁₅ está cerca de His361 y forma puentes de hidrógeno con Gln548 y Glu357 (ver Figura 24).

4.3.2 Simulaciones de MD de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y 5(*S*),15(*S*)-diHETE

Se han realizado dos simulaciones de MD de 100 ns del complejo de Michaelis 15-LOX-1-5(*S*),15(*S*)-diHpETE más dos simulaciones más del complejo de Michaelis 15-LOX-1-5(*S*),15(*S*)-diHETE. Cada simulación comienza, respectivamente, de las estructuras que son representativas de los 4 clústeres más poblados mencionados en el apartado anterior. En lugar de exponer los resultados de cada simulación de MD en detalle, se van a explicar los rasgos generales que comparten estas simulaciones (ver Figura 25).

Si sólo se considera la identidad de los residuos cercanos, el análisis de los resultados indica que no existen diferencias significativas entre los modos de unión de ambos sustratos. El grupo carboxilato forma puentes de hidrógeno, que no se conservan a lo largo de toda la simulación de MD, con diferentes residuos que se encuentran en la entrada de la cavidad de la proteína donde Phe175, Arg403 y Leu408 parecen tener un papel destacado en la unión del grupo carboxilato.

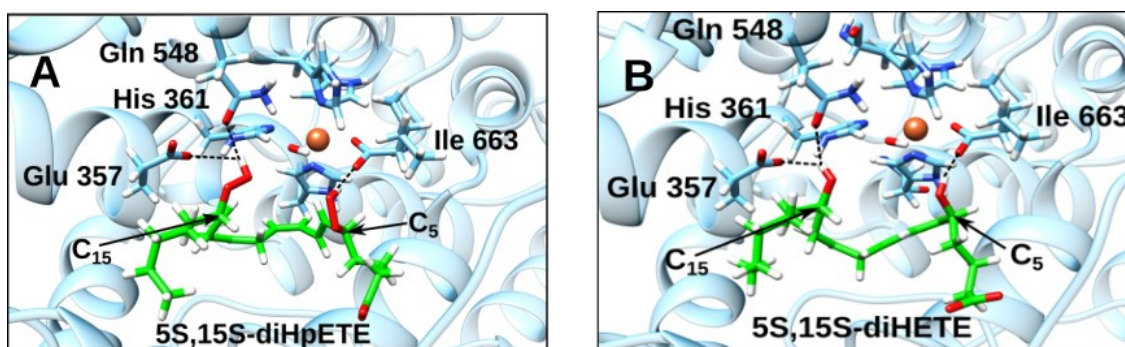


Figura 25. Estructura representativa de las simulaciones de MD que toman como punto de partida el clúster más poblado correspondiente al cálculo de *docking* de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE (panel A) y 5(*S*),15(*S*)-diHETE (panel B). Se han indicado con líneas negras discontinuas los puentes de hidrógeno que forman los grupos hidroperóxido e hidroxilo.

Por un lado, tanto el grupo hidroperóxido como el grupo hidroxilo del C₁₅ forman un puente de hidrogeno con Glu357, que a su vez forma un puente de hidrógeno con His361 (que pertenece a la esfera de coordinación del Fe). Además, en ambos sustratos, Gln548 también interacciona con el sustituyente del C₁₅ y Leu597 está próxima a dicho sustituyente.

Por otro lado, el sustituyente del C₅ forma un puente de hidrógeno con la Ile663 terminal, la cual a su vez forma un puente de hidrógeno con el grupo OH de la esfera de

coordinación del Fe. Asimismo, Leu597, Ile173 y Ile400 se encuentran cerca de este sustituyente.

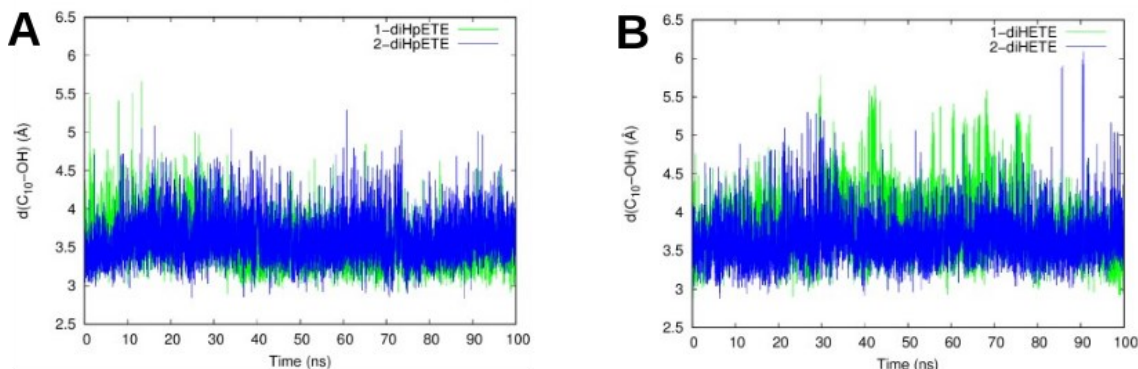


Figura 26. Distancias C₁₀-O (en Å) a lo largo de las simulaciones de MD para el complejo de Michaelis 15-LOX-1-5(*S*),15(*S*)-diHpETE (panel A) y el complejo de Michaelis 15-LOX-1-5(*S*),15(*S*)-diHETE (panel B). Las primeras y segundas simulaciones de MD para cada caso están representadas en verde y azul, respectivamente. O representa el átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ de la 15-LOX-1.

Tabla 1. Distancias promedio (en Å) entre los átomos que intervienen de forma directa en la abstracción de hidrógeno del C₁₀ y porcentaje (%) de estructuras precatalíticas con al menos un átomo de hidrógeno bien orientado para su abstracción para las cuatro simulaciones de MD^a

Simulación de MD	d(C ₁₀ -O)	d(H _{10proS} -O)	d(H _{10proR} -O)	Porcentaje de estructuras precatalíticas
1-diHpETE	3.54	2.79	3.73	83.7
2-diHpETE	3.60	2.86	4.04	79.4
1-diHETE	3.81	3.96	3.19	69.7
2-diHETE	3.64	2.77	3.92	86.4

^a1-diHpETE y 2-diHpETE corresponden a las dos simulaciones de MD donde el sustrato es 5(*S*),15(*S*)-diHpETE; 1-diHETE y 2-diHETE corresponden a las dos simulaciones de MD donde el sustrato es 5(*S*),15(*S*)-diHETE; H_{10proS} y H_{10proR} son los átomos de hidrógeno unidos al C₁₀; O representa el átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ de la 15-LOX-1; la última columna indica el porcentaje de estructuras precatalíticas (estructuras donde por lo menos un átomo de hidrógeno del C₁₀ se encuentra más cerca de 3.0 Å respecto del átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ y, además, dicho átomo de hidrógeno se encuentra bien orientado para su abstracción, es decir, se cumple que d(H_{10proX}-O) ≤ d(C₁₀-O)) que aparecen a lo largo de cada simulación de MD de 100 ns.

Sin embargo, la diferente naturaleza de los sustituyentes cuando se compara 5(*S*),15(*S*)-diHpETE con 5(*S*),15(*S*)-diHETE provoca algunas diferencias sutiles en las posiciones relativas de los sustratos y de los residuos. Ver, por ejemplo, que los paneles A y B de la Figura 25 están lejos de poderse superponer. Además, debido a esta diferente naturaleza

de los sustituyentes (-OH contra -OOH), los átomos de carbono del esqueleto del diHETE se encuentran más próximos a la esfera de coordinación del átomo de hierro que los del diHpETE. Este hecho puede dificultar la reorganización del sustrato en el caso del diHETE.

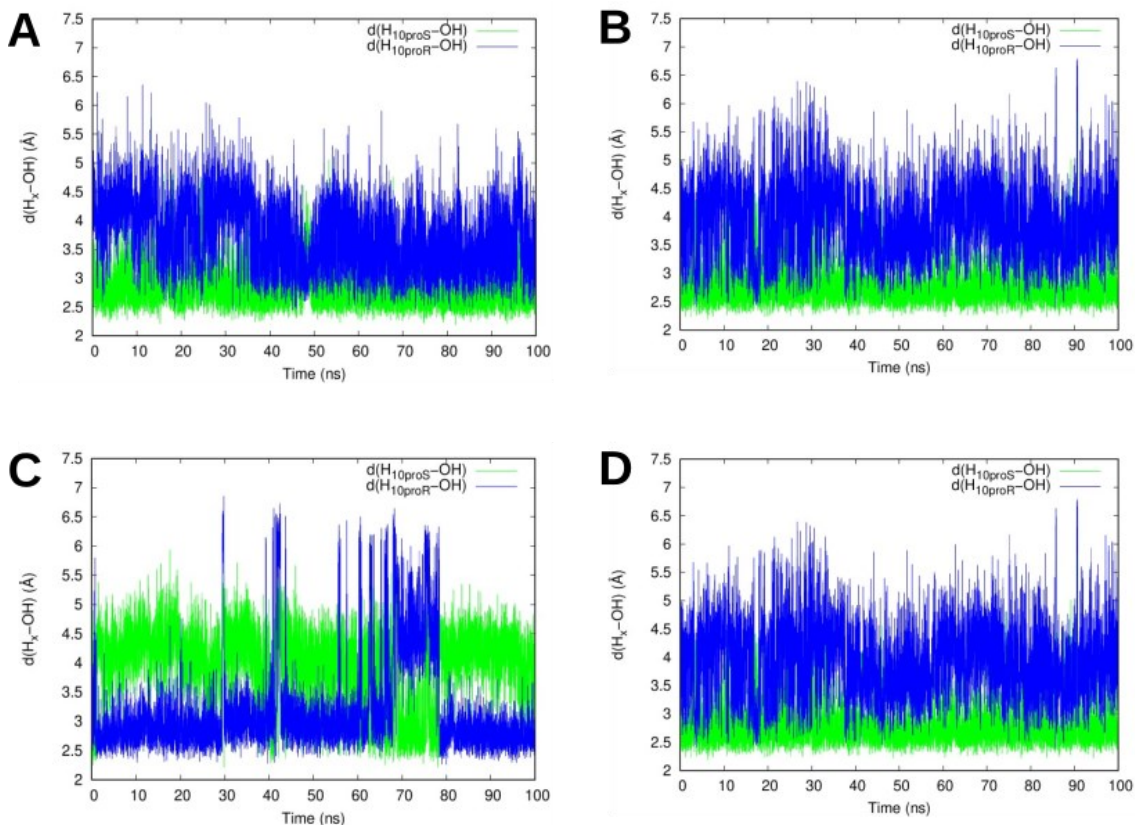


Figura 27. Distancias $H_{10\text{proS}}\text{-O}$ (línea verde) y $H_{10\text{proR}}\text{-O}$ (línea azul) (en Å) a lo largo de la primera (panel A, 1-diHpETE; panel C, 1-diHETE) y la segunda (panel B, 2-diHpETE; panel D, 2-diHETE) simulación de MD para los complejos de Michaelis 15-LOX-1-5(*S*),15(*S*)-diHpETE y 15-LOX-1-5(*S*),15(*S*)-diHETE. O representa el átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ de la 15-LOX-1. $H_{10\text{proS}}$ y $H_{10\text{proR}}$ son los átomos de hidrógeno unidos al C_{10} .

Cabe destacar que la primera etapa de la reacción que cataliza 15-LOX-1 sobre cualquiera de los dos sustratos es la abstracción de hidrógeno del C_{10} . Por lo tanto, vale la pena analizar la evolución de las distancias entre los átomos relevantes en dicha abstracción a lo largo de las simulaciones de MD. En relación con la distancia entre el C_{10} y el átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ de la 15-LOX-1 ($C_{10}\text{-O}$, ver Figura 26), los gráficos de las cuatro simulaciones de MD prácticamente coinciden y dicho átomo de carbono casi siempre se mantiene bastante cercano al átomo de oxígeno que acepta el protón, con la distancia entre ambos fluctuando alrededor de 3.5 Å. Las distancias promedio $C_{10}\text{-O}$ (ver Tabla 1) reflejan este hecho. Por otra parte, casi siempre hay un átomo de hidrógeno del C_{10} a una distancia de 2.5-3 Å, o incluso menor, respecto del átomo de oxígeno que acepta el protón. Para las dos simulaciones de MD correspondientes al complejo de Michaelis 15-LOX-1-5(*S*),15(*S*)-diHpETE este átomo es casi exclusivamente $H_{10\text{proS}}$ (ver Figura 27

paneles A y B), tal y como indican las correspondientes distancias promedio (ver Tabla 1). Sin embargo, el átomo de hidrógeno más cercano para la primera simulación de MD del complejo de Michaelis 15-LOX-1-5(*S*),15(*S*)-diHETE es principalmente H_{10proR}, sin embargo, para la segunda simulación de MD de dicho complejo, el átomo de hidrógeno más cercano es el H_{10proS} (ver Figura 27 paneles C y D). Estos resultados muestran que el C₁₀ rota durante la primera simulación de MD y por consiguiente intercambia las posiciones de sus dos átomos de hidrógeno unidos respecto del átomo de oxígeno que acepta el protón. Esta rotación causa que la distancia promedio correspondiente al átomo de hidrógeno más cercano sea algo mayor (3.19 Å) que en los otros casos (ver Tabla 1). Además, la posición del C₁₀ ha rotado claramente cuando se compara la primera simulación de MD con la segunda. Debido a que el C₁₀ no gira en esta segunda simulación de MD, la distancia promedio H_{10proS}-O es más corta ahora (2.77 Å) y comparable con los dos casos de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE (ver Tabla 1). También se muestra el porcentaje de estructuras precatalíticas (estructuras donde al menos uno de los átomos de hidrógeno del C₁₀ se encuentra más cerca de 3.0 Å del átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ y además, dicho átomo de hidrógeno se encuentra bien orientado para su abstracción, es decir, se cumple que $d(\text{H}_{10\text{proX}}-\text{O}) \leq d(\text{C}_{10}-\text{O})$) a lo largo de las simulaciones de MD en la Tabla 1. Es importante notar que en base a un criterio de distancias, muchas de las estructuras generadas a lo largo de las cuatro simulaciones de MD parecen adecuadas para experimentar la abstracción de uno de los átomos de hidrógeno del C₁₀. De manera similar, la $d(\text{H}_{10\text{proS}}-\text{O})$ promedio es claramente más pequeña que la $d(\text{H}_{10\text{proR}}-\text{O})$ promedio. Como se ha mencionado en la sección 4.1, la 15-LOX-1 no es capaz de catalizar la oxigenación de 5(*S*),15(*S*)-diHETE. Sin embargo, según los resultados que se han obtenido hasta ahora, 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y 5(*S*),15(*S*)-diHETE muestran una tendencia similar respecto a la abstracción de hidrógeno del C₁₀. Entonces, se necesitan cálculos QM/MM para explicar las diferentes reactividades de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y 5(*S*),15(*S*)-diHETE.

4.3.3 Cálculos QM/MM

Con el objetivo de una mayor claridad, se ha mostrado el conjunto de reacciones que se han estudiado para 5(*S*),15(*S*)-diHpETE (Figura 28) y 5(*S*),15(*S*)-diHETE (Figura 29) como sustratos.

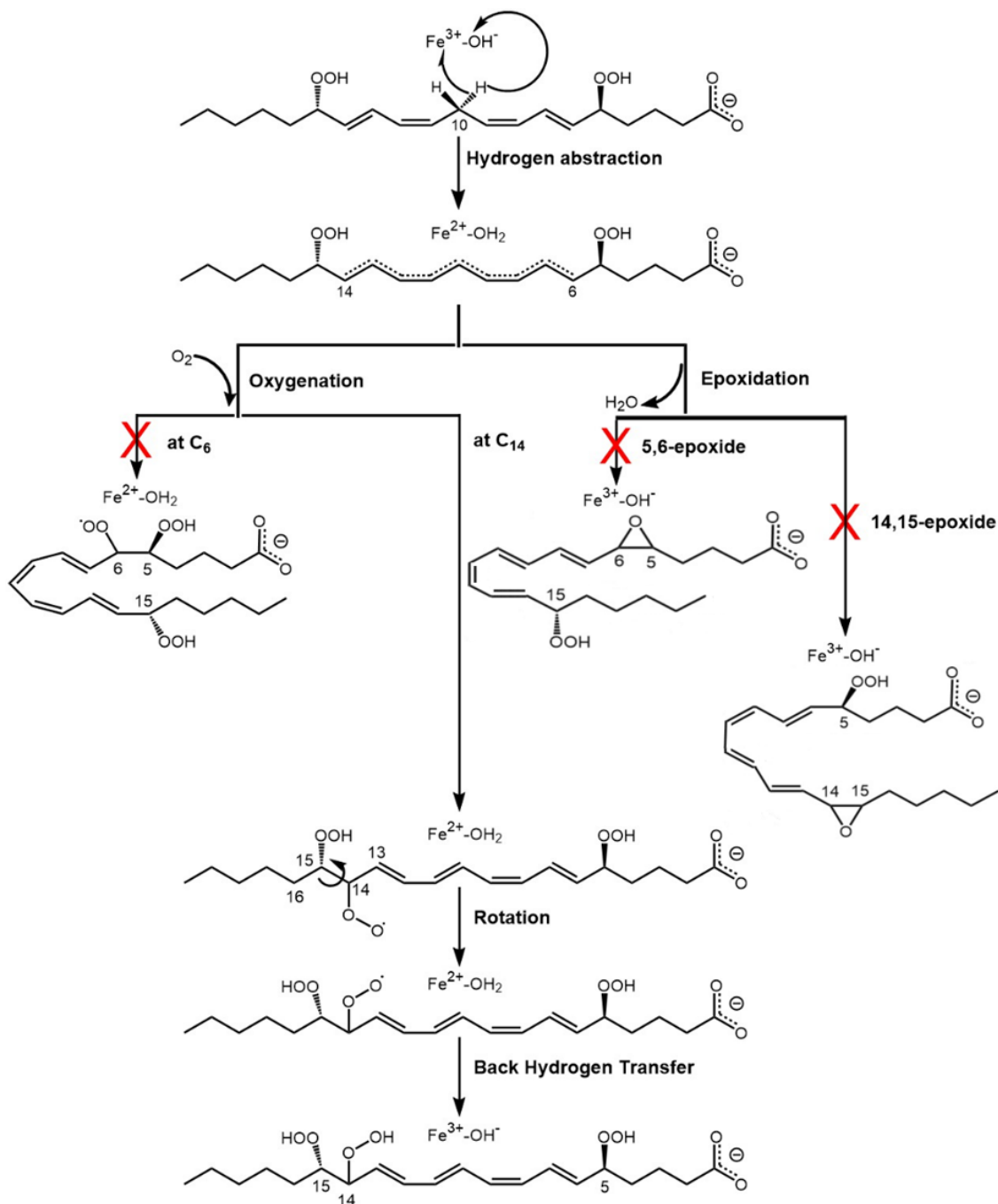


Figura 28. Conjunto de reacciones estudiadas en este capítulo 4 con 5(*S*),15(*S*)-diHpETE como sustrato. Las cruces en rojo indican aquellos caminos de reacción que nuestros cálculos predicen que no son viables.

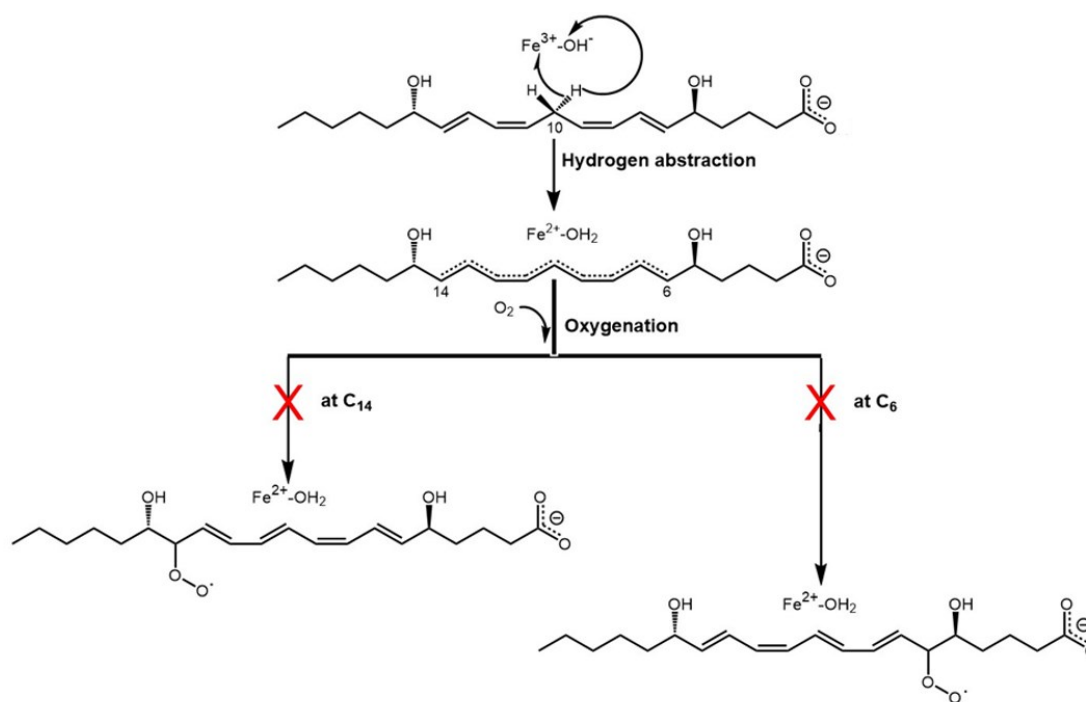


Figura 29. Conjunto de reacciones estudiadas en este capítulo 4 con 5(*S*),15(*S*)-diHETE como sustrato. Las cruces en rojo indican aquellos caminos de reacción que nuestros cálculos predicen que no son viables.

4.3.3.1 Abstracción de un átomo de hidrógeno del C₁₀ a partir de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y 5(*S*),15(*S*)-diHETE

Se ha seleccionado una estructura precatalítica para cada una de las simulaciones de MD realizadas, donde en cada caso, se ha seleccionado para experimentar la abstracción el átomo de hidrógeno del C₁₀ más cercano al átomo de oxígeno que acepta el protón, que en todos los casos seleccionados corresponde al H_{10_{proS}}. Los correspondientes perfiles de energía potencial se han calculado en función de la coordenada de reacción (ver Figura 30) partiendo de las correspondientes geometrías optimizadas para cada estructura. Dicha coordenada de reacción se ha definido como la diferencia entre la longitud del enlace que se rompe (C₁₀-H_x) y la longitud del enlace que se forma (H_x-O). Las estructuras de TS se han localizado a partir del punto de máxima energía de cada perfil. Las barreras resultantes de energía potencial son 9.6 y 9.3 kcal/mol para el sustrato 5(*S*),15(*S*)-diHpETE, y 10.5 y 12.6 kcal/mol para el sustrato 5(*S*),15(*S*)-diHETE. Estos valores indican que es ligeramente más fácil abstraer el átomo de hidrógeno del C₁₀ en el caso de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE, pero la diferencia es demasiado pequeña como para poder explicar por qué no se oxida el 5(*S*),15(*S*)-diHETE.

Es interesante comparar estas reacciones con el caso del AA como sustrato de la 15-LOX-1. Cuando se abstrae un átomo de hidrógeno del C₁₃ del AA, se forma un sistema plano de cinco electrones deslocalizados sobre los cinco átomos de carbono (C₁₁-C₁₅) de un radical π -pentadienilo. Para dicha abstracción se calculó una barrera de energía potencial promedio exponencial que dio un valor de 19.6 kcal/mol²⁷¹. En cambio, el producto de la

abstracción en el caso de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y 5(*S*),15(*S*)-diHETE contiene un sistema plano de nueve electrones deslocalizados sobre los nueve átomos de carbono (C₆-C₁₄) de un radical π -nonatetraenilo. Esta conjugación más extensa del radical π en el producto contribuye a una barrera de abstracción notablemente más baja. Además, las energías de reacción de esta etapa son bastante exérgicas (alrededor de -25 kcal/mol).

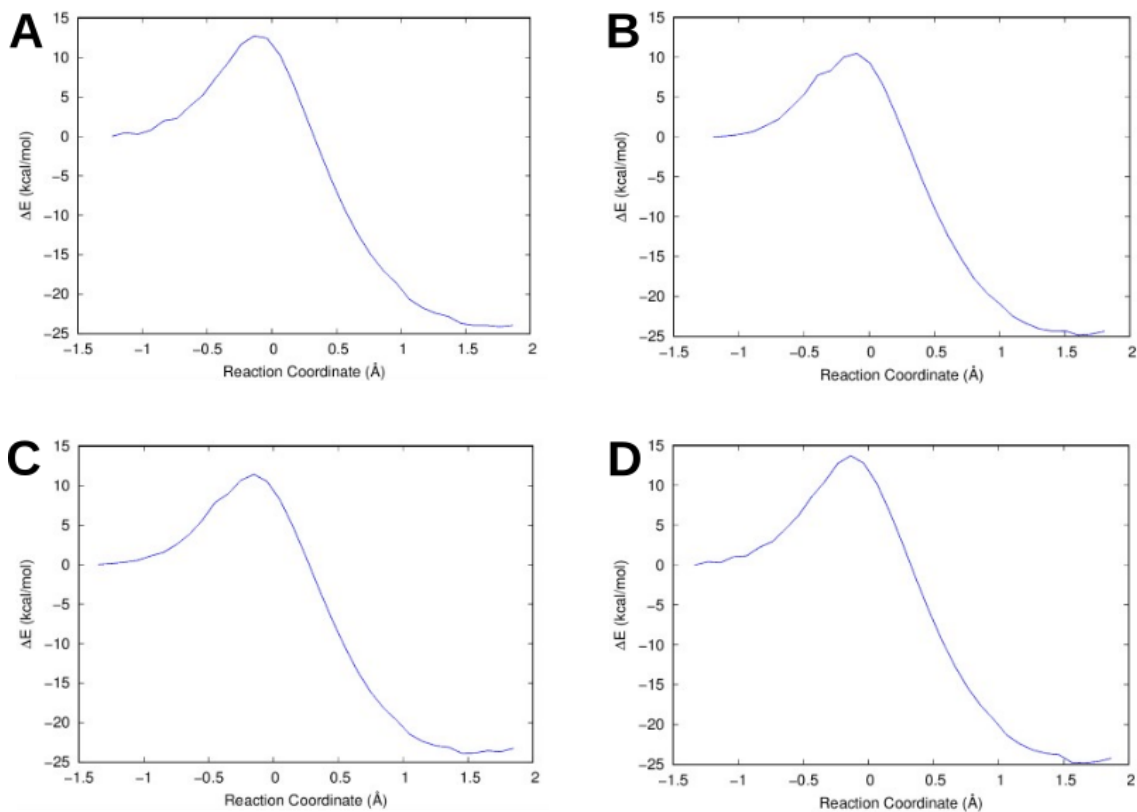


Figura 30. Perfiles de energía potencial para la abstracción de un átomo de hidrógeno del C₁₀. Los paneles A y B corresponden a las dos estructuras seleccionadas para 5(*S*),15(*S*)-diHpETE (1-diHpETE y 2-diHpETE, respectivamente). Los paneles C y D corresponden a las dos estructuras seleccionadas para 5(*S*),15(*S*)-diHETE (1-diHETE y 2-diHETE, respectivamente).

4.3.3.2 Mecanismo de Deshidratación

Como se ha mencionado en la sección 4.1, tras la abstracción de hidrógeno del C₁₀, dos posibles mecanismos competitivos pueden conducir a la formación de LXs. En esta sección, se va a estudiar la viabilidad del mecanismo de deshidratación que comienza con la formación del 5,6-epóxido o del 14,15-epóxido, conduciendo en última instancia a LXA₄ o LXB₄, respectivamente. Nos vamos a centrar exclusivamente en 5(*S*),15(*S*)-diHpETE, ya que 5(*S*),15(*S*)-diHETE no puede formar epóxidos.

En primer lugar, se ha intentado formar el 14,15-epóxido a partir de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE (ver Figura 21). Brash *et al.*²⁷⁸ y Holman *et al.*³² han sugerido un mecanismo para la formación de epóxidos en 5-HpETE catalizado por la 5-LOX. Después de la abstracción de hidrógeno del C₁₀ del 5-HpETE sucede una rotura homolítica del hidroperóxido del C₅

donde el cofactor Fe(II)-OH₂ transfiere un átomo de hidrógeno al radical hidroxilo naciente para formar una molécula de agua y el 5,6-epóxido se cicla por recombinación radical. Se ha explorado si este mecanismo es también válido en el presente caso de la 15-LOX-1. Debido a que ambos productos de la abstracción de hidrógeno del C₁₀ de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE obtenidos son muy similares entre sí, se ha escogido como punto de partida para calcular un perfil de energía potencial para la epoxidación una de las dos geometrías optimizadas de dichos productos. Para este proceso, que involucra la rotura de 2 enlaces y la formación de otros 2, se han probado diferentes coordenadas de reacción. De hecho, se han utilizado diferentes combinaciones lineales de 4, 3 o 2 de estos enlaces para definir la coordenada de reacción. Todas estas coordenadas de reacción presentaban barreras de energía potencial enormes donde la coordenada definida como la diferencia entre la longitud del enlace O-O que se rompe del grupo hidroperóxido del C₁₅ y la longitud del enlace naciente O(hidroperóxido)-C₁₄ resultó ser la que presentaba una barrera menor (ver el perfil de energía potencial correspondiente en el panel A de la Figura 31). A lo largo de esta coordenada de reacción, la rotura del enlace O-O, la formación del epóxido y la transferencia de hidrógeno para formar agua deberían tener lugar de manera sincrónica. El epóxido formado se encuentra en una disposición suprafacial respecto del cofactor. Incluso en este caso más favorable, la barrera de energía potencial alcanza 35.1 kcal/mol. Además, el proceso es endergónico con una energía de reacción de 10.6 kcal/mol.

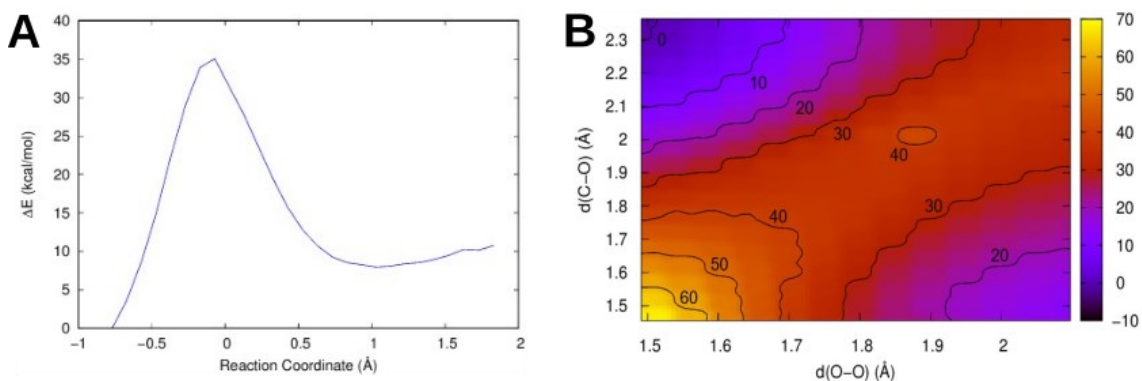


Figura 31. Perfil de energía potencial (panel A) y superficie de energía potencial bidimensional (panel B) correspondiente a la formación del 14,15-epóxido a partir de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE.

Para asegurar que no existen otros caminos más favorables energéticamente, se ha calculado una superficie de energía potencial bidimensional en función de la longitud del enlace O-O y la longitud O(hidroperóxido)-C₁₄ (ver panel B de la Figura 31). Es importante notar que en esta superficie de dos dimensiones, el reactivo se encuentra en la esquina superior izquierda, mientras que el epóxido se encuentra en la esquina inferior derecha. Además, la diagonal de esta superficie bidimensional que conecta el reactivo con el epóxido corresponde al perfil de energía potencial mostrado en la Figura 31. Cabe destacar que no se puede trazar ningún camino de reacción que involucre una barrera de energía potencial menor que aproximadamente 35 kcal/mol. A partir de este resultado, se puede predecir que la 15-LOX-1 no cataliza la formación del 14,15-epóxido del

5(*S*),15(*S*)-diHpETE. Desde un punto de vista estructural, observando el producto de abstracción de hidrógeno del C₁₀ (ver Figura 32), se puede apreciar que esta barrera tan alta es debida al hecho de que el átomo de hidrógeno que debe ser transferido desde el cofactor se encuentra demasiado lejos (5.8 Å) del átomo de oxígeno del grupo hidroperóxido del C₁₅ que acepta dicho átomo de hidrógeno. Es decir, el cofactor se encuentra demasiado lejos del hidroperóxido y la correspondiente transferencia de hidrógeno desde el cofactor al radical hidroxilo naciente para formar una molécula de agua no se prevé que pueda ser posible. Si la formación de la molécula de agua fuera posible, la barrera de energía potencial decrecería, ya que la formación de agua estabiliza el proceso. Además, los átomos de hidrógeno del cofactor Fe(II)-OH₂ están orientados hacia el grupo hidroperóxido del C₅ (ver Figura 32), con el átomo de oxígeno de dicho cofactor situado por encima del enlace C₉-C₁₀ (la distancia desde el átomo de hidrógeno que se ha de transferir al átomo de oxígeno aceptor de hidrógeno del grupo hidroperóxido del C₅ es 3.99 Å).

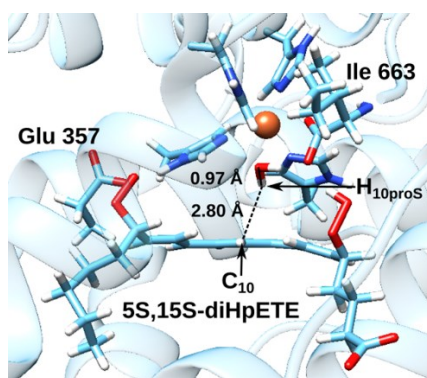


Figura 32. Producto correspondiente al perfil de energía potencial mostrado en el panel A de la Figura 30 para la abstracción de un átomo de hidrógeno del C₁₀ de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE.

En relación con la formación del 5,6-epóxido, por analogía con el 14,15-epóxido, se ha escogido como coordenada de reacción la diferencia entre la longitud del enlace O-O que se rompe del hidroperóxido del C₅ y la longitud del enlace naciente O(hidroperóxido)-C₆. A lo largo de esta coordenada de reacción el sustrato sufre una importante reorganización, especialmente el ángulo diedro definido por el átomo de hidrógeno unido al C₆, el C₆, el C₅ y el átomo de oxígeno del C₅. El enlace O-O del grupo hidroperóxido se rompe, pero el valor más pequeño que alcanza la distancia O-C₆ es de 2 Å, el cual es excesivamente grande en comparación con la longitud de enlace C-O en un epóxido normal (alrededor de 1.4 Å). Si a partir de esta región la distancia entre C₆ y el átomo de oxígeno enlazado a C₅ se escoge como nueva coordenada de reacción y se fuerza la formación del 5,6-epóxido (que ahora está situado de manera antarafacial respecto del átomo de Fe), se obtiene una barrera de energía potencial extremadamente grande de 71.6 kcal/mol. Por consiguiente, es claro que la 15-LOX-1 no es capaz de catalizar la formación del 5,6-epóxido de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE. Estructuralmente, no es viable la formación del 5,6-epóxido ya que está impedida por Ile663 (ver Figura 32), que se encuentra entre el cofactor Fe(II)-OH₂ y el grupo hidroperóxido del C₅. Cabe destacar que esta posición de

la Ile663 es la misma que aparecía en los cálculos de *docking* y en las simulaciones de MD.

En este punto, uno podría preguntarse por qué la 15-LOX-1 es capaz de catalizar la formación del 14,15-epóxido cuando el AA actúa como sustrato siguiendo el mecanismo propuesto por Brash *et al.*²⁷⁸ y Holman *et al.*³², pero nuestros cálculos no predicen la formación de dicho epóxido cuando el sustrato es 5(*S*),15(*S*)-diHpETE. Se ha analizado la evolución de las distancias entre el átomo de carbono C₅ o C₁₅ y el átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ a lo largo de las dos simulaciones de MD de 100 ns de 1-diHpETE y 2-diHpETE, en comparación con una simulación análoga del AA. Los resultados correspondientes al C₁₅ se muestran en la Figura 33. Asimismo, los promedios de estas distancias aparecen en la Tabla 2.

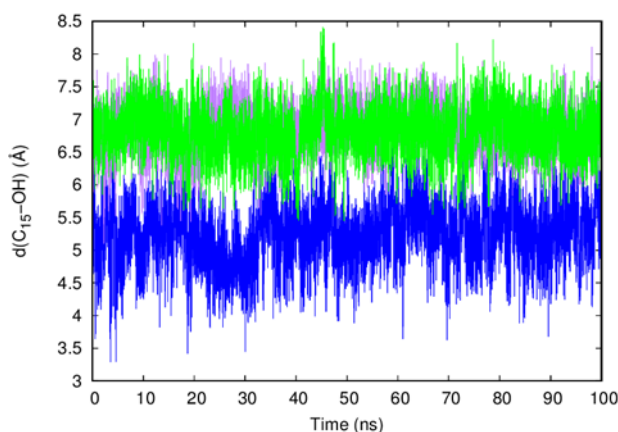


Figura 33. Evolución de la distancia entre C₁₅ y el átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ en función del tiempo para el AA (azul) y el 5(*S*),15(*S*)-diHpETE (lila: 1-diHpETE; verde: 2-diHpETE).

Tabla 2. Distancias promedio y desviaciones estándar para C₅ y C₁₅ respecto del átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻

	d(C ₅ -O) (Å)	d(C ₁₅ -O) (Å)
AA		5.25 ± 0.48
1-diHpETE	5.22 ± 0.35	6.83 ± 0.35
2-diHpETE	5.17 ± 0.26	6.82 ± 0.38

En base a un criterio de distancias, se puede entender por qué para 5(*S*),15(*S*)-diHpETE se predice que la formación del 14,15-epóxido no es posible, mientras que en el caso del AA se tiene la situación opuesta. En promedio (ver Tabla 2), el C₁₅ se encuentra más de 1.5 Å más cerca del átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ en el caso del AA que en el caso de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE. Además, visualizando d(C₁₅-OH) en función del tiempo (Figura 33), se puede apreciar que ninguna de las dos simulaciones de MD de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE tiene su grupo 15-hidroperóxido suficientemente cerca del cofactor Fe(III)-OH⁻ para que la formación del 14,15-epóxido sea posible. En cambio, cuando el AA es el sustrato, hay un cierto número de estructuras en las cuales su C₁₅ se encuentra bastante cerca del cofactor Fe(III)-OH⁻, cosa que permite la formación del 14,15-epóxido. Por otra

parte, como se puede ver en la Tabla 2, según un criterio de distancias, la formación del 5,6-epóxido en el caso de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE debería ser tan probable como la formación del 14,15-epóxido en el AA. Sin embargo, como se ha explicado antes, Ile663 evita la formación del 5,6-epóxido en el caso de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE. Nuestros cálculos de *docking* (Figura 24 paneles A y B), simulaciones de MD (Figura 25 panel A) y cálculos QM/MM indican que el grupo hidroperóxido del C₅ de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE forma un puente de hidrógeno con la Ile663 terminal (que se encuentra en la esfera de coordinación del Fe), que a su vez forma un puente de hidrógeno con el grupo OH del cofactor. Este es el punto clave de por qué el átomo de Fe y su esfera de coordinación, incluyendo el grupo OH, se mantienen claramente más cerca del C₅ y su grupo hidroperóxido que del C₁₅ y su grupo hidroperóxido.

En resumen, se puede concluir que nuestros cálculos no predicen la formación de lipoxinas catalizada por la 15-LOX-1 a partir de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE mediante el mecanismo de deshidratación. Este resultado es compatible con el hecho de que no se haya detectado de manera directa ningún epóxido como intermedio de la formación catalítica de lipoxinas a partir de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE.

4.3.3.3 Mecanismo de Oxigenación

4.3.3.3.1 Búsqueda de canales de acceso del oxígeno

Una vez se ha tratado el mecanismo de deshidratación, se va a estudiar el segundo mecanismo competitivo, la oxigenación. Este mecanismo involucra la adición de una molécula de oxígeno al C₆ o al C₁₄, seguido por la reducción al correspondiente hidroperóxido. Un paso previo necesario para estudiar la adición de la molécula de oxígeno a los radicales π -nonatetraenilo que derivan de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y 5(*S*),15(*S*)-diHETE tras la abstracción de hidrógeno del C₁₀ es determinar los canales de acceso del oxígeno que lo conducen desde la superficie de la proteína hasta la cavidad de ésta.

En relación con 5(*S*),15(*S*)-diHETE, los canales localizados se han agrupado en 8 clústeres de los cuales uno de ellos es claramente el más poblado. Cabe destacar que todos estos canales conducen al C₁₄, cosa que de alguna manera es sorprendente, ya que en principio la adición de oxígeno podría ocurrir tanto en el C₆ como en el C₁₄. Además, el canal representante correspondiente al clúster principal atraviesa el espacio que hay entre las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 18$ (que constituirían la interfase) y permanece abierto a lo largo de toda la simulación de MD analizada (ver Figura 34 paneles A y B).

En relación con 5(*S*),15(*S*)-diHpETE, el número de canales localizados es enorme y han sido agrupados en 169 clústeres de tal manera que el conjunto de todos ellos recubre por completo la cavidad de la proteína. En este caso, estos canales conducen tanto a C₆ como C₁₄, pero el canal representante del clúster principal conduce principalmente al C₁₄ (ver Figura 34 paneles C y D). Desafortunadamente, ninguno de los dos radicales π -nonatetraenilo que derivan de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE tras la abstracción de hidrógeno del C₁₀ tiene abierto el canal del clúster principal. Entonces, se ha extraído otra estructura precatalítica de la primera simulación de MD del complejo de Michaelis 15-LOX-1-5(*S*),15(*S*)-diHpETE que tiene sí abierto el canal de acceso del oxígeno del clúster

principal y se ha repetido la abstracción de hidrógeno del C₁₀. La barrera de energía potencial hasta alcanzar el TS es de 9.3 kcal/mol y otra vez se obtiene un sistema plano de nueve electrones deslocalizados sobre los nueve átomos de carbono (C₆-C₁₄) de un radical π -nonatetraenilo.

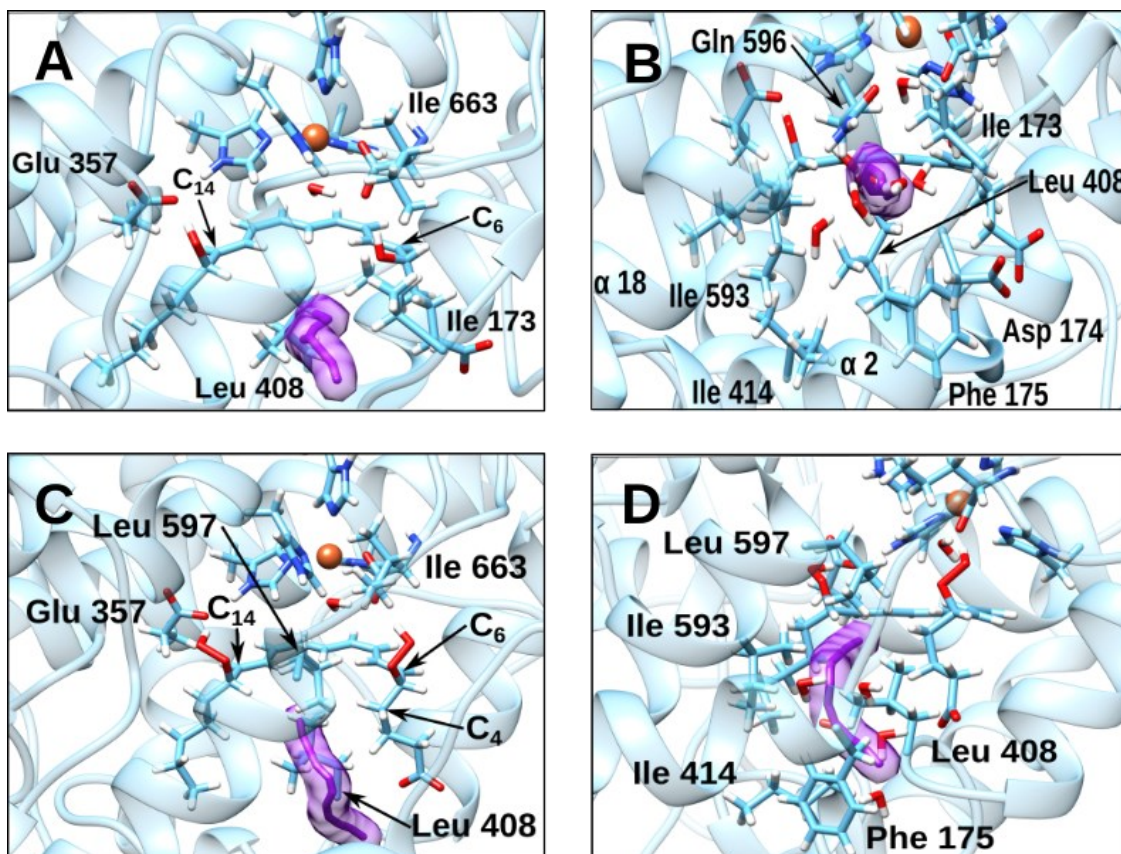


Figura 34. Canal de acceso de la molécula de oxígeno representativo correspondiente al clúster principal (en lila) para los casos de 5(*S*),15(*S*)-diHETE (paneles A y B) y 5(*S*),15(*S*)-diHpETE (paneles C y D). El átomo de Fe está representado en naranja.

4.3.3.3.2 Adición de la molécula de oxígeno

Una vez se han encontrado los canales a través de los cuales tiene lugar la adición de la molécula de oxígeno para ambos sustratos, se ha utilizado uno de los productos de la etapa de abstracción de hidrógeno de 5(*S*),15(*S*)-diHETE (sección 4.3.3.1) y el nuevo producto de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE discutido en la sección anterior para colocar una molécula de oxígeno en el canal abierto que pertenece al clúster más poblado para cada sustrato. Inicialmente, sólo se ha considerado la oxigenación al C₁₄, ya que en todos los casos el canal del clúster principal conduce claramente al C₁₄. La molécula de oxígeno a adicionar se coloca a una distancia de aproximadamente 6 Å del C₁₄. Estos productos de abstracción de hidrógeno que contienen la molécula de oxígeno se han optimizado a nivel QM/MM manteniendo fijada la distancia entre el átomo de oxígeno más cercano de la molécula de oxígeno entrante y el C₁₄ ($d(\text{C}_{14}\text{-O}_2)$). Estas estructuras optimizadas se han empleado como puntos de partida para construir los perfiles de energía potencial

correspondientes al ataque de la molécula de oxígeno donde la coordenada de reacción se ha definido como $d(C_{14}-O_2)$.

En relación con 5(*S*),15(*S*)-diHETE, se puede ver que Leu408, Ile414, Ile593, Ile173, Asp174, Phe175 y Gln596 limitan el diámetro del canal a través del cual la molécula de oxígeno se aproxima suprafacialmente (ver Figura 34 paneles A y B). Además, el diámetro de este canal es bastante grande de manera que podría contener algunas moléculas de agua aparte de la molécula de oxígeno. De hecho, las contiene y éstas forman un puente de hidrógeno con la molécula de oxígeno. Para describir correctamente esta interacción, se tuvo que añadir una molécula de agua a la región QM. Durante la adición de oxígeno, se produce una importante reorganización entre la molécula de oxígeno y esta molécula de agua, de tal manera que el enlace de hidrógeno entre ellas se conserva a lo largo de la adición de oxígeno, cosa que la estabiliza. Además, el acercamiento de la molécula de oxígeno al C_{14} es suprafacial, cosa que causa una gran distorsión en el C_{14} y da lugar a la formación de un enlace cis entre C_{12} y C_{13} . En consecuencia, el producto optimizado formado no es el adecuado, ya que el enlace $C_{12}-C_{13}$ es trans tanto en LXA₄ como en LXB₄. Es importante notar que el acercamiento antarafacial está impedido por la Leu408. La barrera de energía potencial para este ataque suprafacial de la molécula de oxígeno es de 34.1 kcal/mol (esta barrera es incluso mayor, 43.8 kcal/mol, si se elimina la molécula de agua), la cual es demasiado alta para que el proceso sea viable, y la reacción es exergónica por -22.4 kcal/mol. La barrera aparece cuando la distancia entre la molécula de oxígeno y el C_{14} está alrededor de 2.0 Å. Teniendo todo en cuenta, se puede concluir que la adición de oxígeno en el caso de 5(*S*),15(*S*)-diHETE no es posible ni en el C_6 (ningún canal conduce al C_6 debido al impedimento estérico producido por Ile173, Leu408 y el grupo hidroxilo del C_5) ni en el C_{14} .

En relación con 5(*S*),15(*S*)-diHpETE, el canal de oxígeno seleccionado es más estrecho que en el caso del 5(*S*),15(*S*)-diHETE y se vuelve incluso más estrecho a medida que se acerca al C_{14} , de manera que sólo la molécula de oxígeno cabe en él. Leu408, Ile414, Phe175, Ile593 y Leu597 limitan el diámetro del canal (ver Figura 34 paneles C y D). Además, ahora la adición de la molécula de oxígeno al C_{14} es antarafacial. De este modo, este acercamiento da lugar a un enlace trans entre C_{12} y C_{13} , cosa que está de acuerdo con las estructuras experimentales de las lipoxinas. En este caso, la molécula de oxígeno penetra en el canal prácticamente sin barrera hasta que alcanza un primer mínimo de energía ($d(C_{14}-O_2) = 2.64$ Å), donde se debe superar una pequeña barrera de energía potencial (la correspondiente estructura de TS aparece en $d(C_{14}-O_2) = 2.03$ Å, con una barrera de 3.5 kcal/mol) para alcanzar un segundo mínimo de energía ($d(C_{14}-O_2) = 1.51$ Å). El proceso entre ambos mínimos de energía es exergónico por 2.5 kcal/mol. Para cerciorarse si este proceso es realmente favorable, se ha combinado el método de *umbrella sampling* (US)^{241,242,279} con el *weighted histogram analysis method* (WHAM)²⁴³ para calcular la barrera de energía de Gibbs para la adición de oxígeno al C_{14} de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE. Se seleccionaron siete ventanas y cinco ventanas para cubrir, respectivamente, el camino hasta el primer mínimo y la evolución al segundo mínimo de energía donde cada ventana constaba de 0.3 ps de equilibración y 2 ps de producción. Tomando como referencia el inicio del camino, el acercamiento al primer mínimo involucra una barrera de energía de Gibbs de 1.4 kcal/mol y, para la segunda etapa, 3.1 kcal/mol. Estos números indican que la adición es un proceso favorable. Todos estos resultados prueban

que la adición de la molécula de oxígeno al C₁₄ para el caso de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE es bastante fácil, conduciendo posteriormente a la formación de LXB₄.

Por completitud, también se ha estudiado la posibilidad de la adición de la molécula de oxígeno al C₆ para el caso de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE. El procedimiento ha sido el mismo que para la adición al C₁₄, pero ahora la coordenada de reacción viene definida por la distancia C₆-O₂. Sin embargo, este proceso implica una barrera de energía potencial demasiado alta de 34.9 kcal/mol. El acercamiento de la molécula de oxígeno es antarafacial, pero está bloqueado por el C₄ del 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y las cadenas laterales de Leu408 y Leu597 (ver Figura 34 panel D). Todos ellos deben apartarse para permitir a la molécula de oxígeno pasar hacia el C₆. Además, se produce una reorganización importante de C₆ y C₇ para acomodar a la molécula de oxígeno entrante al C₆. Todo esto explica por qué LXA₄ no se puede formar.

Teniendo en cuenta todos los resultados de esta sección, se puede concluir que la adición de oxígeno es la etapa del mecanismo de reacción que explica por qué 5(*S*),15(*S*)-diHETE no es oxidado, mientras que 5(*S*),15(*S*)-diHpETE sí lo es, pero sólo en C₁₄ y no en C₆.

4.3.3.3 Rotación de uno de los enlaces C-C que contiene el grupo peróxido en el caso del 5(*S*),15(*S*)-diHpETE

Como se ha explicado en la sección 4.1, después de la abstracción de hidrógeno del C₁₀, el mecanismo de oxigenación para producir lipoxinas involucra la adición de oxígeno molecular seguida por una retrodonación de hidrógeno al radical peróxido para formar el correspondiente hidroperóxido.

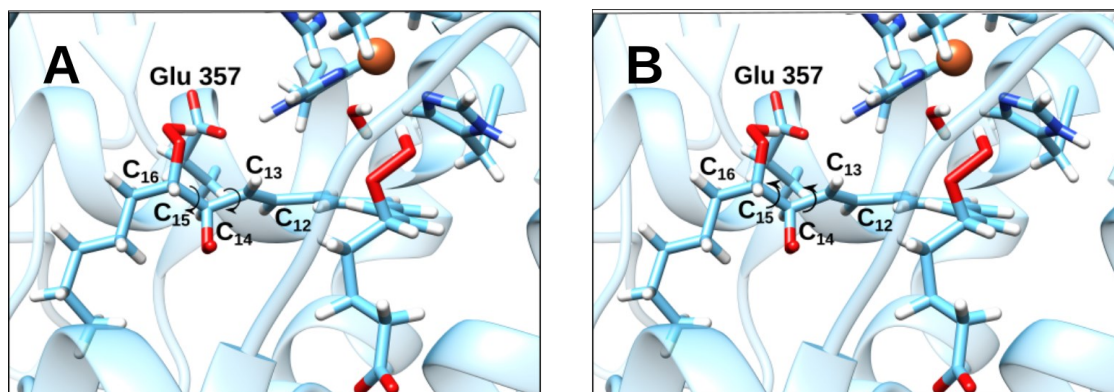


Figura 35. Definición de las dos rotaciones C-C antihorarias (panel A) y horarias (panel B) consideradas en el producto optimizado de la oxigenación de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE en el C₁₄. Estas rotaciones están definidas mirando el sustrato desde el lado del grupo carboxilato.

Debido al hecho de que la molécula de oxígeno ataca al radical π -nonatetraenilo que deriva de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE en el C₁₄ de manera antarafacial respecto del átomo de Fe, para que sea viable la retrodonación por parte del cofactor Fe(II)-OH₂ de la enzima es necesaria una rotación de uno de los enlaces C-C que contiene la fracción peróxido para conseguir una disposición suprafacial. En esta sección, sólo se ha estudiado esta

rotación para 5(*S*),15(*S*)-diHpETE, ya que éste es el único sustrato que puede ser oxigenado.

Como punto de partida para comenzar esta rotación se ha seleccionado el producto optimizado de la oxigenación de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE en el C₁₄. La coordenada de reacción para alcanzar una disposición suprafacial del radical peróxido se definió como una rotación alrededor de uno de los enlaces C-C que contienen este grupo. Este movimiento se puede describir mediante el ángulo diedro que está centrado en los átomos de carbono que definen el enlace alrededor del cual se lleva a cabo la rotación. Por lo tanto, dos ángulos diedros, $\angle C_{12}-C_{13}-C_{14}-C_{15}$ y $\angle C_{13}-C_{14}-C_{15}-C_{16}$, pueden ser considerados, ya que hay dos enlaces C-C que contienen el radical peróxido. Además, es posible definir dos direcciones de rotación para cada ángulo diedro, horaria y antihoraria (estas rotaciones están definidas mirando al sustrato desde el lado del carboxilato, ver Figura 35). De este modo, existen cuatro posibles rotaciones de ángulos diedros para alcanzar la disposición suprafacial. Sin embargo, visualizando la estructura de partida, se puede notar que ambas rotaciones antihorarias (ver Figura 35 panel A), producirían *clashes* importantes entre la enzima y el sustrato (especialmente entre el peróxido del C₁₄ y Glu357), cosa que requeriría una mayor reorganización del sustrato para que fueran posibles. Por este motivo, se pueden descartar ambas rotaciones antihorarias. Por un lado, la rotación horaria (ver Figura 35 panel B) del ángulo diedro $\angle C_{12}-C_{13}-C_{14}-C_{15}$ no pudo alcanzar una rotación completa del radical peróxido desde una disposición antarafacial a una suprafacial. Este resultado es debido a la naturaleza flexible del sustrato. Nuestros cálculos a lo largo de la correspondiente coordenada de reacción muestran que el radical peróxido apenas puede progresar hacia una disposición suprafacial, pero en cambio, son el resto de los átomos de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE los que se reorganizan a medida que avanza la rotación. Por otro lado, la rotación horaria del ángulo diedro $\angle C_{13}-C_{14}-C_{15}-C_{16}$ sí que conduce a una disposición suprafacial del radical peróxido, aunque el átomo de oxígeno externo de este radical no está orientado hacia el átomo de Fe. El perfil de energía potencial para esta rotación exhibe una curva bastante suave. El producto suprafacial (ver Figura 36) aparece a 64.1° y la correspondiente estructura de TS involucra una barrera de energía potencial de 14.5 kcal/mol, con una energía de reacción de 13.3 kcal/mol.

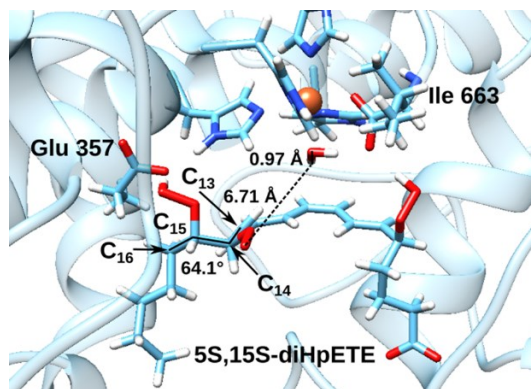


Figura 36. Producto correspondiente a la rotación horaria del ángulo diedro $\angle C_{13}-C_{14}-C_{15}-C_{16}$ que conduce a una disposición suprafacial del radical peróxido que se encuentra en el C₁₄ del 5(*S*),15(*S*)-diHpETE.

4.3.3.4 Retrodonación de hidrógeno al grupo peróxido en el caso de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE

Una vez el radical peróxido ha alcanzado una disposición suprafacial mediante una rotación adecuada alrededor del ángulo diedro $\langle C_{13}-C_{14}-C_{15}-C_{16}$, se necesitan más cambios conformacionales debido a que el átomo de oxígeno externo de este radical peróxido no está orientado hacia el átomo de Fe. Más concretamente, se necesita un movimiento rotacional adicional para que este átomo de oxígeno se acerque a uno de los átomos de hidrógeno del cofactor Fe(III)-OH. Con el objetivo de tanto corregir esta mala orientación como llevar a cabo la retrodonación de hidrógeno al radical peróxido, se ha definido la coordenada de reacción como la diferencia entre la longitud del enlace que se rompe (O-H del OH₂ del cofactor) y la longitud del enlace que se forma (O-H del grupo hidroperóxido final).

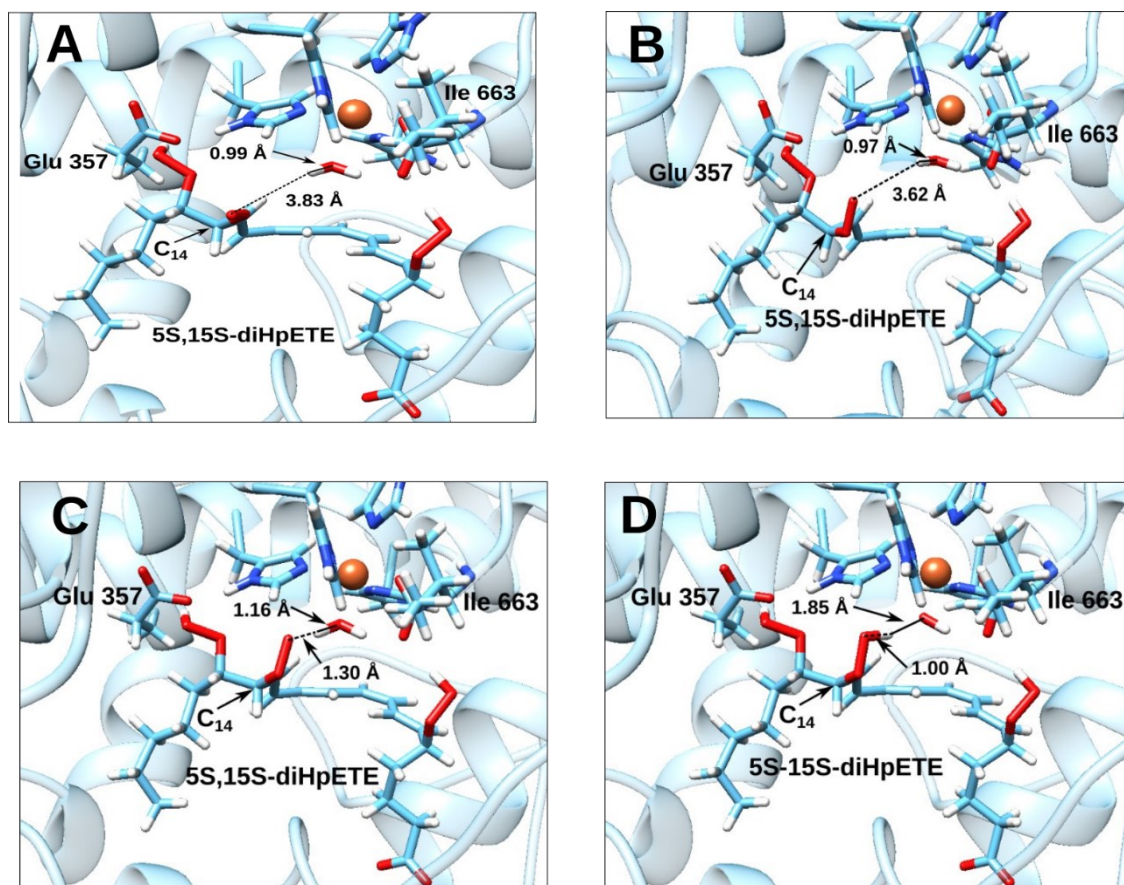


Figura 37. Estructura de TS (panel A) y de producto (panel B) correspondiente al acercamiento entre el átomo de oxígeno externo del radical peróxido que se encuentra en el C₁₄ del 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y el átomo de hidrógeno del cofactor Fe(II)-OH₂ que será retrodonado. Estructura de TS (panel C) y de producto (panel D) correspondiente a la retrodonación de hidrógeno.

Como punto de partida para este perfil de reacción se ha escogido la estructura optimizada a nivel QM/MM de la estructura suprafacial de mínima energía que aparece cuando el ángulo diedro $\langle C_{13}-C_{14}-C_{15}-C_{16}$ asume un valor de 64.1° (ver Figura 36). Este

proceso presenta dos barreras de energía potencial. Por un lado, la primera barrera corresponde a una importante reorganización del sustrato y a una rotación de la molécula de H₂O del cofactor Fe(II)-OH₂. La reorganización del sustrato consiste en rotaciones alrededor de los enlaces C-C, las cuales siempre mantienen la estereoquímica de los enlaces C=C del producto final, y de una rotación alrededor del enlace C-O del radical peróxido. Como resultado de todas estas rotaciones, el átomo de oxígeno externo del radical peróxido ya se encuentra bastante próximo al átomo de hidrógeno del cofactor Fe(II)-OH₂ que será retrodonado y, además, ambos átomos están enfocados entre sí. Todo este proceso se desarrolla con una barrera de energía potencial de 15.6 kcal/mol y una energía de reacción de 8.5 kcal/mol (ver Figura 37 paneles A y B). Por otro lado, la segunda barrera corresponde exclusivamente a la retrodonación de hidrógeno. La correspondiente estructura de TS localizada (ver Figura 37 panel C) involucra una barrera de energía potencial de 19.3 kcal/mol y una energía de reacción de 1.9 kcal/mol respecto al mínimo de energía (ver Figura 37 panel B) localizado después de la primera barrera. Como resultado de este proceso, se reduce el radical peróxido a un grupo hidroperóxido y se regenera el cofactor Fe(III)-OH⁻ para iniciar un nuevo ciclo catalítico. De esta manera, se forma el *5S,14R,15S-trihydroperoxy-6E,8Z,10E,12E-icosatetraenoic acid* (*5S,14R,15S-triHpETE*) (ver Figura 37 panel D), el cual tiene que ser finalmente transformado a LXB₄ mediante una reductasa.

4.4 Conclusiones

Se requiere una comprensión profunda de las rutas biosintéticas que producen mediadores lipídicos proresolutivos especializados, tales como las lipoxinas, tanto para activar rutas de resolución endógenas como un nuevo enfoque terapéutico, como para obtener fármacos exógenos eficientes para el tratamiento de enfermedades humanas que involucran inflamaciones crónicas severas, incluyendo COVID-19^{5,8,280}. En este capítulo 4, se han combinado simulaciones de MD y cálculos QM/MM para lograr un entendimiento profundo a nivel molecular sobre la formación de lipoxinas, que son supresoras de la inflamación, mediante la ruta biosintética que involucra *5(S),15(S)-diHpETE* y la catálisis de la 15-LOX-1 de reticulocito.

El proceso comienza por medio de una abstracción de hidrógeno bastante fácil del C₁₀ de *5(S),15(S)-diHpETE* catalizada por 15-LOX-1. La barrera de abstracción es bastante más baja que en el caso del AA debido a la conjugación que se extiende sobre los nueve átomos de carbono (C₆-C₁₄) del radical π -nonatetraenilo formado. Después de esto, nuestros resultados no predicen la formación de lipoxinas mediante el mecanismo de deshidratación. Este resultado es compatible con el hecho de que ningún epóxido ha sido detectado de manera directa como intermedio en la formación catalítica de las lipoxinas a partir de *5(S),15(S)-diHpETE*. De hecho, en el producto de abstracción de hidrógeno del C₁₀, los átomos de hidrógeno del cofactor Fe(II)-OH₂ están orientados hacia el grupo hidroperóxido del C₅, con su átomo de oxígeno situado por encima del enlace C₉-C₁₀. En consecuencia, el átomo de hidrógeno a ser transferido se encuentra demasiado lejos del átomo de oxígeno aceptor de hidrógeno del grupo hidroperóxido del C₁₅, cosa que impide acoplar la formación del epóxido con la formación de agua. El grupo hidroperóxido del C₅ de *5(S),15(S)-diHpETE* forma un puente de hidrógeno con la Ile663 terminal (que

forma parte de la esfera de coordinación del Fe), que a su vez forma un puente de hidrógeno con el grupo OH del cofactor. Esto es clave para entender por qué el átomo de Fe y su esfera de coordinación, incluyendo el grupo OH, se mantienen claramente más cerca del C₅ y su grupo hidroperóxido que del C₁₅ y su grupo hidroperóxido. Por consiguiente, no se prevé que la formación del 14,15-epóxido sea posible. Por otra parte, la formación del 5,6-epóxido es inaccesible porque está impedida por la Ile663, que está colocada entre el cofactor Fe(II)-OH₂ y el grupo hidroperóxido del C₅.

La formación de lipoxinas tiene lugar por medio de la adición de una molécula de oxígeno a los radicales π -nonatetraenilo que provienen de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE por la abstracción de hidrógeno del C₁₀. La adición de una molécula de oxígeno al C₁₄ es muy sencilla, conduciendo después a la formación de LXB₄. Sin embargo, la adición de una molécula de oxígeno a C₆ está bloqueada por el C₄ de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y las cadenas laterales de Leu408 y Leu597. Además, existe una importante reorganización de C₆ y C₇ para acomodar la entrada de la molécula de oxígeno al C₆. Todo esto explica por qué no se forma LXA₄ a partir de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE mediante la catálisis de 15-LOX-1.

Debido a que la molécula de oxígeno ataca al C₁₄ de manera antarafacial respecto del átomo de Fe, para hacer viable la retrodonación de hidrógeno por parte del cofactor Fe(II)-OH₂ de 15-LOX-1 se requiere una rotación de uno de los enlaces C-C que contiene el grupo peróxido para que éste alcance una disposición suprafacial. Entonces, el radical peróxido es reducido a un grupo hidroperóxido. De esta manera, se forma el 5*S*,14*R*,15*S*-trihydroperoxy-6*E*,8*Z*,10*E*,12*E*-eicosatetraenoic acid (5*S*,14*R*,15*S*-triHpETE), que debe ser finalmente convertido a LXB₄ por medio de la acción de una reductasa.

Para poder establecer una comparación, también se ha estudiado el comportamiento de 5(*S*),15(*S*)-diHETE como sustrato. La abstracción de hidrógeno del C₁₀ resulta ser algo más lenta que en el caso de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE, pero otra vez la barrera de energía es bastante más baja que en el caso del AA. Cabe destacar que 5(*S*),15(*S*)-diHETE no puede generar ningún epóxido. Además, la adición de una molécula de oxígeno no es posible ni en el C₆ (no existe ningún canal de acceso de oxígeno a este átomo de carbono) ni en el C₁₄ (el acercamiento antarafacial a éste está impedido por Leu408). De esta manera, la 15-LOX-1 no puede convertir 5(*S*),15(*S*)-diHETE en una lipoxina, cosa que está de acuerdo con los resultados experimentales²⁴⁴.

Capítulo 5

Desorden instantáneo en los complejos de Michaelis enzima-sustrato para calcular la barrera de energía de Gibbs de una reacción enzimática

Los resultados presentados a lo largo del capítulo 5 han sido publicados en el siguiente artículo:

Physical Chemistry Chemical Physics, vol. 23, pp. 13042-13054, **2021**

5.1 Introducción

Las enzimas son catalizadores biológicos, que presentan un gran tamaño en comparación con los catalizadores convencionales, que pueden llegar a acelerar las reacciones químicas hasta muchos ordenes de magnitud (casi 20 en algunos casos)²⁸¹⁻²⁸³. Esta gran aceleración hace posible que los procesos vitales para los seres vivos tengan lugar en una escala de tiempo compatible con la vida. Por esta razón, es muy interesante poder estudiar desde un punto de vista teórico la cinética de dichas enzimas, más concretamente, calcular las barreras de energía de Gibbs de las reacciones catalíticas de éstas y las constantes de velocidad de reacción asociadas.

Las enzimas distan mucho de ser estructuras rígidas, de hecho, son moléculas que presentan una gran flexibilidad. Aunque todavía se está discutiendo sobre el origen del poder catalítico de las enzimas (catálisis de origen electrostático o contribuciones dinámicas)²⁸⁴, la dinámica enzimática es relevante para las constantes de velocidad, sin

importar cual es la fuerza motriz de la catálisis enzimática. Una vez se ha formado el complejo de Michaelis enzima-sustrato, el conjunto de núcleos del sistema explora un gran número de configuraciones en una superficie de energía potencial de alta dimensionalidad que puede contener un valle de reactivos o más^{285,286}. Diferentes valles de reactivos pueden llevar a cabo la misma función pero contribuir a la reacción total con diferentes constantes de velocidad de reacción²⁸⁷⁻²⁸⁹. De esta manera, las velocidades catalíticas de las enzimas a menudo exhiben fluctuaciones dinámicas muy grandes sobre escalas de tiempo que son mucho más largas que k_{cat} , principalmente asociadas con cambios conformacionales lentos que conectan los diferentes valles de reactivos. La existencia de estos valles de reacción relativamente estables que presentan conformaciones de una vida larga en comparación con la escala de tiempo de las reacciones enzimáticas explica el *desorden dinámico* observado en estudios *single molecule* de algunas reacciones enzimáticas^{287,288,290-296}. En estos casos las velocidades de interconversión entre los valles de reactivos correspondientes pueden ser mucho más lentas que las constantes de velocidad catalíticas y se necesitarían simulaciones de MD muy largas para producir transiciones entre ellos y, especialmente, para alcanzar un equilibrio estadístico. Por consiguiente, la ergodicidad (que consiste en que todos los estados del colectivo estén poblados) no se puede aplicar en la práctica al colectivo de todas las configuraciones de la superficie de energía potencial correspondiente al complejo de Michaelis enzima-sustrato. La población de cada valle de reactivos no está gobernada por un control termodinámico, sino por un control cinético y cada valle de reactivos actúa como una enzima independiente con una constante de velocidad diferente (la velocidad global de formación de producto está determinada por una distribución de constantes de velocidad detectada experimentalmente).

El *desorden dinámico* es un fenómeno observado experimentalmente. Cuando sólo existe un valle de reactivos (o en el caso de rápida interconversión entre los valles), el *desorden dinámico* no aparece y la reacción enzimática puede ser descrita con una sola constante de velocidad. En este caso, puede tener lugar el *desorden instantáneo*, que también es dinámico, pero es un concepto totalmente diferente²⁹⁷. El *desorden instantáneo* puede ser definido como fluctuaciones dinámicas instantáneas en el complejo de Michaelis enzima-sustrato con escalas de tiempo mucho más cortas que k_{cat} , conduciendo a diferentes barreras de energía que no pueden ser detectadas individualmente de manera experimental.

Un valle de reactivos comprende un colectivo de configuraciones nucleares de los complejos de Michaelis enzima-sustrato que puede ser minuciosamente explorado mediante una simulación de MD de longitud larga. La interconversión entre todas las configuraciones de baja energía dentro del mismo valle de reactivos normalmente consiste en cambios conformacionales locales relativamente fáciles que son bastante rápidos a temperaturas fisiológicas. Estas interconversiones ocurren en escalas de tiempo mucho menores que k_{cat} . En estas condiciones, aquellas configuraciones nucleares del valle de reactivos se encuentran en equilibrio local (están distribuidas de acuerdo con una distribución de Boltzmann) entre sí, y todo el valle contribuye al flujo de reacción con una sola k_{cat} . La PES dentro de este valle de reacción es extremadamente rugosa, con un gran número de estructuras de mínima energía. Comenzando a partir de diferentes configuraciones nucleares iniciales (*snapshots*) generadas por simulaciones de MD en

equilibrio, se pueden construir múltiples caminos de mínima energía (MEPs) mediante métodos QM/MM donde cada uno de ellos conecta un mínimo de energía potencial dentro del valle de reactivos con un mínimo de energía potencial en el valle de productos asociado, cruzando a través de la estructura de TS correspondiente. Entonces, se puede encontrar un amplio rango de barreras de energía^{271–274,286,297–308}. De esta manera, por ejemplo, para la primera etapa de la reacción catalizada por la proteasa HIV-1 se han calculado barreras de energía de Gibbs que oscilan de 14.5 kcal/mol a 51.3 kcal/mol²⁹⁷. Esta dispersión se atribuyó a diferentes mecanismos, diferentes conformaciones del centro activo y a variaciones en el entorno electrostático del centro activo.

La pregunta ahora es cómo aprovechar el cálculo de la distribución de las barreras de energía potencial para obtener información sobre la constante de velocidad experimental k_{cat} , o, por lo menos, sobre la barrera de energía de Gibbs ΔG^{\ddagger} de la reacción catalítica cuando sólo existe un valle de reactivos. En otras palabras, ¿cómo determina el desorden instantáneo la cinética de la reacción? El objetivo de esta sección es llevar a cabo una discusión sobre dicho tema. Se ha deducido, en base a la teoría de *Free Energy Perturbation* (FEP), una ecuación para calcular esta barrera de energía de Gibbs que presenta algunas diferencias conceptuales importantes con respecto a los enfoques habituales y, además, se ha propuesto una manera práctica para implementarla. Para ilustrar todos estos conceptos, se ha aplicado esta metodología a cuatro reacciones enzimáticas.

5.2 Base teórica

Vamos a asumir que se ha realizado una simulación de MD de suficiente longitud como para cubrir un único valle de reacción para un complejo de Michaelis enzima-sustrato dado. Entonces, se escoge de manera aleatoria un amplio conjunto de *snapshots* (o lo que es lo mismo, de configuraciones nucleares instantáneas) a partir de la trayectoria de MD generada. La optimización de energía de estos *snapshots* conduce a un conjunto de estructuras de mínima energía que pueden ser usadas como estructuras de partida para construir caminos de mínima energía potencial que conduzcan a los correspondientes productos. Como se ha mencionado en el apartado anterior, se espera que se obtenga una amplia dispersión de barreras de energía potencial QM/MM ΔV^{\ddagger} (o barreras de energía ΔE^{\ddagger} si se incluyen las correcciones térmicas y de energía de punto cero) debido al *desorden instantáneo*. A partir de aquí se va a asumir que ΔV^{\ddagger} y ΔE^{\ddagger} no difieren de manera significativa. Se han propuesto bastantes procedimientos para promediar estas barreras, aunque el denominado promedio exponencial es el más usado^{299–304,307,309–311}:

$$\Delta E_{AV}^{\ddagger} = -RT \left\{ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \exp \left(\frac{-\Delta E_i^{\ddagger}}{RT} \right) \right\} \quad (28)$$

donde R es la constante universal de los gases ideales, T es la temperatura, ΔE_i^{\ddagger} es la barrera de energía para cada *snapshot* y N es el número de *snapshots* seleccionados.

Se obtiene la ecuación 28 si se cumplen las siguientes suposiciones: a) el valle de reactivos se puede descomponer en un gran número de subvalles de reactivos que no se solapan entre sí; b) el colectivo de estructuras dentro de cada subvalle de reactivos α evoluciona al correspondiente subvalle de productos con una constante de velocidad k_α que se puede calcular a través de la teoría del estado de transición convencional como una función de la barrera de energía de Gibbs asociada a dicho subvalle α , $\Delta G_\alpha^{\ddagger}$:

$$k_\alpha = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G_\alpha^{\ddagger}}{RT}\right) \quad (29)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann y h es la constante de Planck;

c) debido a que todos los subvalles de reactivos que componen la totalidad del valle de reactivos también se encuentran en equilibrio local entre sí, la constante de velocidad global k_{cat} se puede obtener mediante un promedio aritmético de un número representativo de k_α ponderado de acuerdo con la población P_α de sus correspondientes subvalles de reactivos α (es decir, de acuerdo con sus energías de Gibbs relativas):

$$k_{cat} = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G^{\ddagger}}{RT}\right) = \sum_\alpha P_\alpha k_\alpha \quad (30)$$

d) cada *snapshot* i escogido a lo largo de la trayectoria de MD se puede clasificar como perteneciente a un subvalle reactivo α particular. Después de la optimización de energía de este *snapshot*, se calcula el correspondiente camino de mínima energía potencial y se obtiene el valor de la barrera de energía ΔE_i^{\ddagger} ; e) todos los *snapshots* pertenecientes al mismo subvalle de reactivos α tienen prácticamente el mismo valor de ΔE_i^{\ddagger} , el cual puede ser considerado una buena estimación de $\Delta G_\alpha^{\ddagger}$; f) la población P_α viene dada por el número de veces que un *snapshot* i con ΔE_i^{\ddagger} que pertenece al subvalle reactivo α aparece a lo largo de la simulación de MD, la cual sigue una distribución de Boltzmann. Bajo estas condiciones, se alcanza la ecuación 28 combinando las ecuaciones 29 y 30, haciendo una estimación de cada $\Delta G_\alpha^{\ddagger}$ como el valor común de ΔE_i^{\ddagger} que se supone que se obtiene para cualquier *snapshot* perteneciente al subvalle reactivo α , y usando ΔE_{AV}^{\ddagger} como una aproximación razonable de la barrera de energía de Gibbs ΔG^{\ddagger} de la reacción catalítica cuando sólo existe un valle de reactivos.

Sin embargo, no existe una manera práctica para clasificar un *snapshot* dado en un subvalle de reactivos α particular, tal y como se asume en d). Los *snapshots* que deberían estar asociados al mismo valor de $\Delta G_\alpha^{\ddagger}$ y, de acuerdo con la suposición e), al mismo valor de ΔE_i^{\ddagger} (de manera que sólo contribuirían al peso de este valor), están realmente asociados, como resultado del cálculo, a diferentes (o incluso muy diferentes) valores de ΔE_i^{\ddagger} . Entonces, deberíamos ser conscientes de que una dispersión importante de valores de ΔE_i^{\ddagger} puede aparecer en realidad para *snapshots* correspondientes al mismo subvalle reactivo α , en desacuerdo con la suposición e). De esta manera, vamos a suponer, sólo como ejemplo, que se escogen los *snapshots* 1 y 2 y que los valores de energía calculados

para éstos son $\Delta E_1^\ddagger = 15$ kcal/mol y $\Delta E_2^\ddagger = 22$ kcal/mol, respectivamente. Es imposible saber si ambos pertenecen al mismo subvalle de reactivos α o si el *snapshot* 1 se encuentra en el subvalle de reactivos α y el *snapshot* 2 se encuentra en el subvalle de reactivos β . En el segundo caso, ambos valores deberían introducirse una vez en la ecuación 28, pero no estamos seguros de si ΔE_1^\ddagger y ΔE_2^\ddagger son una buena estimación de sus correspondientes $\Delta G_a^{\circ\ddagger}$ y $\Delta G_\beta^{\circ\ddagger}$, respectivamente. En el primer caso, o bien ΔE_1^\ddagger o bien ΔE_2^\ddagger (pero sólo uno de ellos) debería introducirse dos veces en la ecuación 28 como estimación de $\Delta G_a^{\circ\ddagger}$ (dos veces debido al factor de población P_a), pero no estamos seguros sobre cuál de ellos es una buena estimación de $\Delta G_a^{\circ\ddagger}$, o incluso si alguno de ellos lo es. En resumen, la aplicación de la ecuación 28 resulta ser dudosa como resultado de las suposiciones en las cuales se basa.

De todas formas, el principal problema cuando se aplica la ecuación 28 radica en la manera como se escogen los *snapshots* considerados. Debido a que en la suma de la ecuación 28 cuanto más pequeño es el valor de ΔE_i^\ddagger más grande es su contribución, se ha sugerido que se debería obtener el mejor resultado seleccionando o filtrando de alguna manera, por ejemplo, basándose en parámetros catalíticos, unos pocos *snapshots* de manera que la barrera de energía esperada de éstos sea baja³⁰⁷. El caso límite consistiría en seleccionar únicamente el *snapshot* con el ΔE_i^\ddagger más pequeño. Ambos enfoques se usan de manera común en estudios QM/MM de reacciones enzimáticas. Sin embargo, se ha aceptado³⁰⁹ que el *snapshot* de barrera de energía más alta no contribuye de manera significativa a dicha suma, pero sí al número de *snapshots* N usados. Por lo tanto, si se desprecian estos *snapshots* de barrera de alta energía, se subestimarán ΔE_{AV}^\ddagger .

La exactitud de hacer una estimación de la barrera de energía de Gibbs ΔG^\ddagger como ΔE_{AV}^\ddagger normalmente se evalúa³⁰⁹ cogiendo como referencia un cálculo del potencial de fuerza media (PMF)^{312,313} a partir de simulaciones de *Umbrella Sampling* (US)²⁷⁹. En este punto sería interesante pensar sobre el significado de la energía de Gibbs. La energía de Gibbs se usa para tener en cuenta la contribución de no sólo una única estructura, sino de un colectivo de estructuras. Si sólo se considera una única estructura, la transformación logarítmica del único término de Boltzmann conduce a una energía. En cambio, si se considera un colectivo de estructuras, la suma de los términos de Boltzmann correspondientes da la función de partición y su transformación logarítmica conduce a la energía de Gibbs. Sin embargo, en la práctica no se puede obtener la función de partición global para la totalidad del valle de reactivos. Entonces, si sólo se escoge un mínimo reactivo, con sólo un MEP asociado y sólo un PMF, sólo se obtendrá una estimación del valor de $\Delta G_a^{\circ\ddagger}$ correspondiente a un subvalle de reactivos α . Es decir, al construir un sólo PMF realmente se explora una región bastante limitada del espacio de configuraciones alrededor del MEP, cosa que está muy lejos de explorar la totalidad del valle de reactivos. Tanto la reducida longitud de tiempo (hasta diez picosegundos en cálculos QM/MM) por cada ventana como el potencial que aplica un sesgo para explorar la ventana asociada a cada valor de la coordenada de reacción, confinan la exploración únicamente a los alrededores del MEP seleccionado. Por cierto, ¿Qué MEP se escoge? Ya que dependiendo del MEP escogido, se obtendrá una barrera de energía de Gibbs alta o baja. Incluso en el caso de una barrera de energía de Gibbs baja, la probabilidad de aparición de la

correspondiente estructura de reactivos de partida (y, por consiguiente, de su baja barrera) se sigue sin conocer. El método de FEP²⁷⁹ que normalmente se utiliza como alternativa al US presenta un problema similar. En resumen, en los casos donde es relevante el *desorden instantáneo*, con la aparición de una amplia dispersión de configuraciones nucleares y barreras por todo el valle de reactivos, ninguno de los valores particulares de ΔG_a^{\ddagger} puede llegar a ser representativo de la barrera de energía de Gibbs ΔG^{\ddagger} de la reacción catalítica. De esta manera, la comparación de ΔE_{AV}^{\ddagger} obtenida a partir de la ecuación 28 (donde se obtendrá el *snapshot* i a partir de, por ejemplo, una trayectoria de MD larga de 100 ns) con un valor de ΔG_a^{\ddagger} calculado a partir de simulaciones de US (con una exploración por ventana de hasta 10 ps) no tiene mucho sentido.

Aquí se propone una manera más fiable para deducir y aplicar una ecuación bastante similar a la ecuación 28. Esta deducción no utiliza ninguna de las suposiciones, de a) a f), que se han detallado más arriba. La teoría de *Free energy perturbation*²⁷⁹ se puede usar para calcular la diferencia de energía de Gibbs entre un sistema de referencia (0) con un Hamiltoniano H_0 y un sistema perturbado (1) caracterizado por el Hamiltoniano H_1 . Para una simulación de MD en el colectivo isotérmico-isobárico (NPT) la diferencia de energía de Gibbs entre el sistema perturbado 1 y el sistema de referencia 0 se puede escribir de manera clásica como:

$$\Delta G_{0 \rightarrow 1} = G_1 - G_0 = -RT \ln \frac{\int e^{-\frac{H_1(\vec{r}^N, \vec{p}^N) + PV_1}{RT}} d\vec{r}^N d\vec{p}^N}{\int e^{-\frac{H_0(\vec{r}^N, \vec{p}^N) + PV_0}{RT}} d\vec{r}^N d\vec{p}^N} = -RT \ln \langle e^{-\frac{(H_1 - H_0) + P(V_1 - V_0)}{RT}} \rangle_0 \quad (31)$$

donde \vec{r}^N y \vec{p}^N representan el conjunto de $3N$ coordenadas Cartesianas atómicas y los momentos conjugados atómicos, respectivamente, H es el Hamiltoniano nuclear clásico, V_0 y V_1 son los volúmenes de los sistemas 0 y 1, respectivamente, en cada configuración (el término aditivo PV en la exponencial de la integral no aparece en un colectivo canónico (NVT)), R es la constante universal de los gases y $\langle \rangle_0$ denota un promedio sobre el colectivo isotérmico-isobárico explorado a partir del estado de referencia equilibrado. Debido a que las simulaciones de MD sólo exploran un valle de reactivos, no hay diferencias significativas entre V_0 y V_1 ni cambios significativos del volumen V_0 a lo largo de la simulación. Entonces, se pueden ignorar los volúmenes de la ecuación 31 y se puede realizar la simulación de MD en el colectivo canónico (NVT) sin error apreciable. De esta manera, para conseguir la diferencia de energía de Gibbs entre el estado 1 y el 0, en cada configuración del sistema de referencia equilibrado se cambia el correspondiente Hamiltoniano al correspondiente del sistema perturbado, y las diferencias $\Delta H = H_1 - H_0$ se recopilan para calcular el promedio sobre el colectivo. Usando coordenadas Cartesianas, el término cinético es separable del término potencial y se cancela cuando se realiza el promedio de la diferencia.

Se propone el siguiente protocolo para estudiar el *desorden instantáneo* en una reacción enzimática. Definimos el colectivo de reactivos como el sistema de referencia 0 y el colectivo de TSs como el sistema perturbado 1. Se calcula una simulación de MD del

complejo de Michaelis enzima-sustrato para generar una gran cantidad de configuraciones nucleares. Se deben seleccionar de manera aleatoria muchos *snapshots* (es decir, que pueblen muchas regiones diferentes del valle de reactivos). Para cada *snapshot* seleccionado, se localiza un mínimo de energía potencial y se construye el correspondiente MEP usando un método QM/MM. De esta manera, cada *snapshot* seleccionado del sistema de referencia θ está asociado a una estructura de TS que pertenece al sistema perturbado 1 . En este caso, para cada *snapshot* i se cumple $\Delta H = \Delta V_i^\ddagger$ (o incluso ΔE_i^\ddagger), es decir, ΔH es igual a la barrera de energía potencial QM/MM del correspondiente MEP. Teniendo en cuenta que el conjunto de *snapshots* a lo largo de la simulación de MD aparecen de acuerdo con una distribución de Boltzmann en el colectivo de referencia, el promedio en el segundo miembro de la ecuación 28 es sólo una discretización de la integral del último miembro de la ecuación 31, siempre y cuando se incluya un número suficientemente grande de *snapshots* seleccionados en la ecuación 28. Por otra parte, la minimización en las direcciones ortogonales al MEP permite asumir que se exploran suficientemente las configuraciones de baja energía en el colectivo de TSs por medio de la simulación en el colectivo de reactivos, de tal manera que los cálculos FEP convergen razonablemente. De esta manera, el promedio exponencial en el segundo miembro de la ecuación 28 directamente corresponde a la barrera de energía de Gibbs ΔG^\ddagger de la reacción catalítica cuando sólo existe un valle de reactivos. En este punto vale la pena comentar que la barrera de energía de Gibbs depende (ver ecuación 31) del cociente entre las funciones de partición de los TSs y los reactivos. Cuanto más accesibles son las fluctuaciones en un sistema dado, mayor es el valor de las correspondientes funciones de partición. La generación adecuada de estas fluctuaciones en los reactivos está garantizada mediante una exploración suficientemente larga del colectivo de reactivos. En cambio, las fluctuaciones en el colectivo de los TSs, que normalmente son menos pronunciadas que en el de reactivos, son consecuencia de la dispersión de los reactivos que trasladan dicha dispersión a los correspondientes MEPs y a la diversidad de máximos de estos MEPs. En este punto, es crucial entender que cualquier intento de seleccionar únicamente unos pocos *snapshots* “adecuados” con configuraciones “idóneas” que conduzcan a barreras de energía bajas para ser incluidos en la ecuación 28 es un procedimiento inadecuado, el cual proporcionará una buena estimación de la barrera de energía de Gibbs experimental únicamente de manera fortuita. Por el contrario, se deberían incluir en el promedio exponencial tantos *snapshots* como fuera posible, los cuales deberían pertenecer a tantas regiones diferentes del valle de reactivos como fuera posible. Evidentemente, aplicar esto de manera estricta podría implicar el cálculo de un número excesivamente grande de MEPs QM/MM, cosa que haría que esto no fuera viable con un coste computacional razonable. Para eludir este problema, se debería usar un criterio adecuado, que dependería de cada reacción enzimática particular, para identificar *a priori* aquellos *snapshots* que correspondan a las estructuras precatalíticas, es decir, aquellos que pertenezcan a la parte limitada del espacio configuracional explorado por la simulación de MD que puede ser adecuada para la catálisis (con una barrera de energía previsiblemente no demasiado alta). Como se ha explicado más arriba, los *snapshots* de barrera de energía alta no contribuyen significativamente a la suma del segundo miembro de la ecuación 28 (éstos

añaden aproximadamente ceros), pero incrementan el valor de N en el denominador y deben ser considerados.

Teniendo en cuenta todo esto, si N es el número de *snapshots* seleccionados de manera aleatoria a lo largo de la simulación de MD y n es el número de estructuras precatalíticas identificadas después de aplicar el correspondiente filtro de acuerdo con el criterio adoptado, se puede llegar a la siguiente ecuación:

$$\Delta G^{\ddagger} = -RT \ln \frac{n}{N} - RT \ln \left\{ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \exp \left(\frac{-\Delta E_i^{\ddagger}}{RT} \right) \right\} \quad (32)$$

Esta ecuación refleja el hecho de que la barrera de energía de Gibbs de la reacción enzimática se debe a dos contribuciones diferentes. El primer término del segundo miembro de la ecuación indica como de difícil es que aparezcan las estructuras precatalíticas a lo largo de la exploración.

El segundo término proviene de la contribución promediada de manera exponencial de las estructuras precatalíticas (es importante notar que este promedio se puede calcular usando sólo un conjunto representativo de las estructuras precatalíticas, de tal manera que n en este segundo término se convierte en el número de estructuras incluidas en dicho conjunto representativo). En consecuencia, tanto las estructuras no precatalíticas como las precatalíticas contribuyen a la barrera de energía de Gibbs de la reacción enzimática y la contribución de cada tipo de estructuras no se conoce *a priori*. Por si fuera poco, en general, las estructuras precatalíticas presentarán una dispersión considerable de barreras de energía y la existencia de un cierto número de barreras de energía alta provocará un aumento en la energía de Gibbs. Entonces, se debe enfatizar que la barrera de energía de Gibbs de acuerdo con la ecuación 32 es el resultado de una larga exploración del valle de reactivos. En cambio, la barrera de energía de Gibbs resultante de un cálculo PMF sólo incluye una pequeña exploración de los alrededores de un único MEP, y por lo tanto sólo se explora una región bastante estrecha del valle de reactivos.

Para ilustrar todos estos conceptos, nos vamos a centrar en cuatro reacciones enzimáticas. En primer lugar, la hidrólisis de un enlace glicosídico catalizada por la enzima *Thermus thermophilus* β -glycosidase (Ttb-gly), una glucósido hidrolasa³¹⁴, y el mutante Y284P Ttb-gly. Estas dos reacciones se han estudiado en colaboración con la Dra. Sonia Romero. A continuación, las reacciones de abstracción de hidrógeno de C₁₃ y C₇ del AA catalizadas por la 15-LOX-1 de conejo³⁰⁰.

5.3 Hidrólisis de un enlace glicosídico catalizada por la enzima *Thermus thermophilus* β -glycosidase

Se ha comenzado con una reacción enzimática donde tanto las simulaciones de MD del complejo de Michaelis enzima-sustrato como los perfiles de energía potencial correspondientes a cada *snapshot* seleccionado se han calculado a nivel QM/MM, específicamente, al nivel QM(SCC-DFTB)/AMBER.

La Ttb-gly cataliza la hidrólisis de residuos β -D-glicosil terminales. Un ejemplo de éstos sería el 4-nitrofenil β -D-fucopiranososa (*p*NP-Fuc). La primera etapa de la reacción

(glicosilación) consiste en el ataque nucleófilo del residuo Glu338 al átomo de carbono anomérico C₁ del anillo fucosa (Fuc) y en la rotura del enlace glicosídico del sustrato *p*NP-Fuc. Se forma un intermedio unido de forma covalente glicosil-enzima con Glu338, donde el residuo Glu164 protonado facilita esta etapa por medio de la protonación del oxígeno glicosídico del grupo 4-nitrofenol (*p*NP) saliente. En la segunda etapa (desglicosilación), Glu164 desprotona la molécula de agua entrante, que ataca como un nucleófilo al átomo de carbono C₁ del anillo de fucosa en una reacción de hidrólisis que rompe el enlace glicosídico entre la fucosa y Glu338, produciendo fucosa (ver Figura 38). En presencia de un sustrato aceptor apropiado, como el *N*-methyl-*O*-benzyl-*N*-(β -*D*-glucopyranosyl)-hydroxylamine (BnON(Me)-Glc), la transglicosilación puede competir con la hidrólisis en la etapa de desglicosilación y conducir a la formación del producto *N*-methyl-*O*-benzyl-*N*-(β -*D*-fucopyranosyl(1-4) β -*D*-glucopyranosyl)-hydroxylamine.

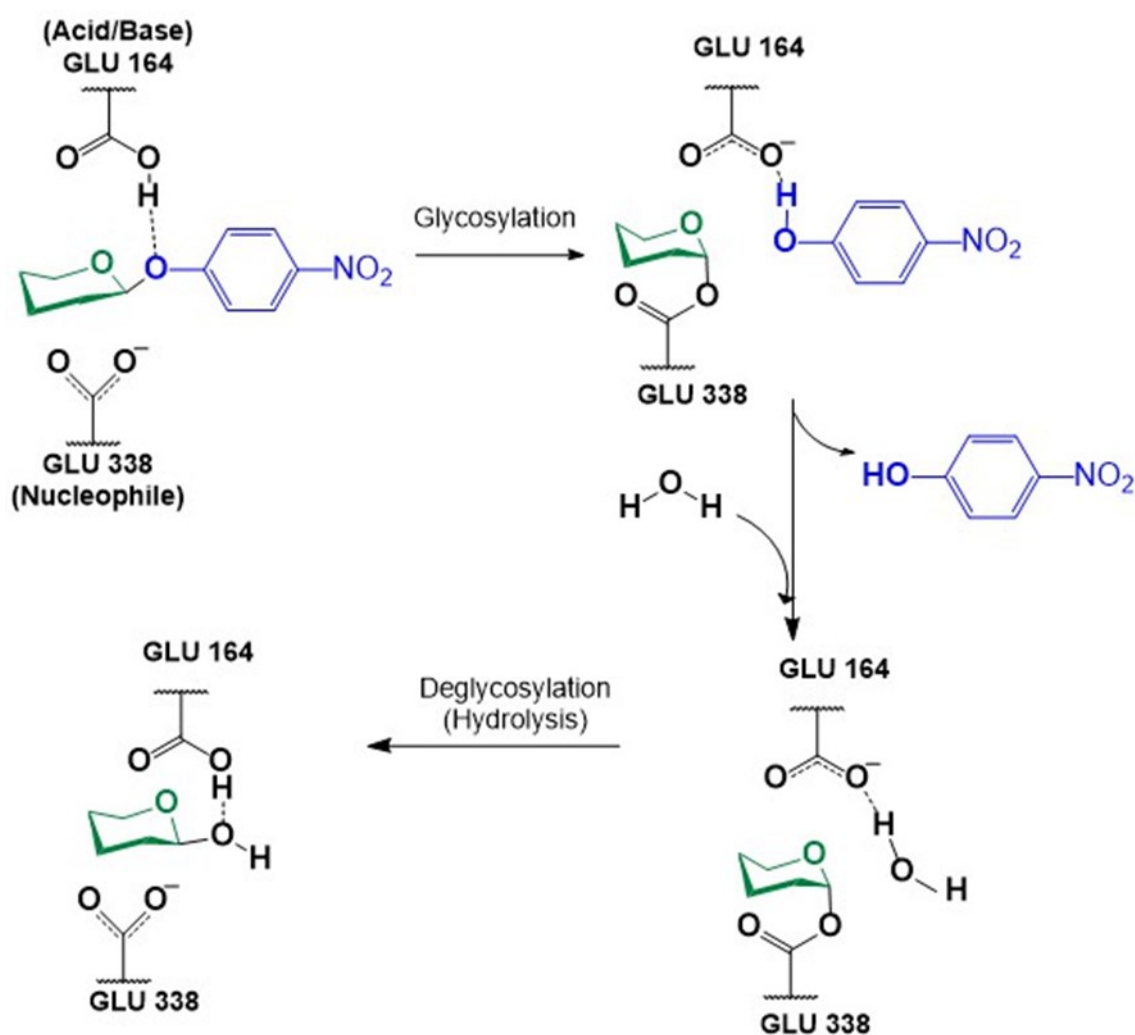


Figura 38. Mecanismo catalítico de la glicosilación y desglicosilación (hidrólisis) de 4-nitrophenyl β -*D*-fucopyranoside catalizadas por la enzima Ttb-gly. El anillo de fucosa y el grupo saliente *p*NP están representados en verde y azul, respectivamente. Es necesario que una molécula de agua se coloque en el lugar adecuado para que la reacción de hidrólisis sea posible.

En un artículo previo de nuestro grupo de investigación³¹⁴, se estudió el mecanismo de reacción de dichas etapas de glicosilación y deglicosilación (tanto para la hidrólisis como para la transglicosilación). Ahora se van a aprovechar aquellas simulaciones para estudiar la etapa de deglicosilación correspondiente a la hidrólisis de *p*NP-Fuc. Se van a presentar tanto los resultados correspondientes a Ttb-gly *wild-type* como al mutante Y284P Ttb-gly.

5.3.1 Detalles metodológicos para la enzima *Thermus thermophilus* β -glycosidase

Se seleccionó el intermedio unido de forma covalente glicosil-enzima como estructura de partida para estudiar la reacción de hidrólisis catalizada por la Ttb-gly *wild-type* en la sección 5.3, el cual se obtuvo en el trabajo previo³¹⁴ como resultado del proceso de glicosilación. En cambio, se utilizó como estructura de partida para la reacción de hidrólisis catalizada por el mutante Y284P Ttb-gly el intermedio correspondiente localizado en el caso de dicho mutante (resultados no publicados). Dichos intermedios se modificaron eliminando todas las coordenadas de *p*NP, excepto aquéllas que correspondían al grupo hidroxilo recién formado (debido a la transferencia de protón por parte de Glu164) que se convirtieron en las de una molécula de agua mediante el programa PyMol³¹⁵. Los sistemas se solvataron con una caja cúbica de moléculas de agua TIP3P²⁵⁵ preequilibradas. Además, se añadieron tres iones de sodio para neutralizar la carga de dichos sistemas. En total, los sistemas estaban constituidos por más de 70200 átomos cada uno. Sus coordenadas se relajaron a nivel MM restringiendo el movimiento de todos los átomos de la proteína y de la molécula de agua recién formada (aceptor de azúcar). Entonces, se llevó a cabo una simulación de MD corta (210 ps) donde también se aplicaron las restricciones anteriores a nivel MM para permitir la reorganización de las moléculas de agua en el centro activo bajo condiciones de frontera periódicas (PBC) dentro del colectivo canónico NVT a 300 K. Se controló la temperatura mediante dinámica de Langevin²¹⁶. Todos los cálculos MM se realizaron usando el *force field* de AMBER ff14SB²⁵⁰ para la proteína, mientras que para la parte del azúcar se utilizaron los *atom types* y parámetros de GLYCAM06j³¹⁶. A lo largo de las simulaciones de MD, los enlaces covalentes que contienen átomos de hidrógeno se fijaron por medio del algoritmo SHAKE²¹⁵ y las interacciones electrostáticas de largo alcance se trataron usando el *particle-mesh Ewald method*³¹⁷. En todas las trayectorias de MD se empleó un *time step* de 1 fs. Además, se realizaron todas las simulaciones utilizando la versión de *software* AMBER16 (GPU(CUDA)) del paquete de programas PMEMD^{214,318}.

Como se explicará en la sección 5.3.2, se seleccionó el *snapshot* final de la simulación de MD a nivel MM como punto de partida para iniciar una simulación de MD a nivel QM(SCC-DFTB)/AMBER, a partir de la cual se escogieron bastantes *snapshots* para generar una gran cantidad de perfiles de energía potencial correspondientes a la reacción de hidrólisis (ver más abajo). Los perfiles de energía potencial se calcularon a nivel QM(SCC-DFTB)/AMBER utilizando el paquete de programas modular ChemShell^{234,257}, donde TURBOMOLE²⁵⁸ se empleó para obtener las energías y gradientes QM al nivel SCC-DFTB³¹⁹ (*Self-Consistent Charge Density Functional Tight-Binding*). Por otra

parte, las energías y gradientes MM se han evaluado usando DL_POLY²⁵⁹, que también está implementado en el paquete de programas de ChemShell, y el *force field* de AMBER. Se ha empleado el esquema de *embedding* electrostático²²⁸ para permitir que las cargas puntuales MM polaricen la densidad electrónica de la región QM. Para las interacciones no enlazantes MM y QM/MM no se ha empleado ningún *cutoff*. Para los cálculos QM/MM, la caja cúbica de moléculas de agua se redujo a una esfera de 30 Å de radio que rodea la totalidad de la proteína. A todos los residuos y moléculas de agua que se encuentran dentro de una esfera de 15 Å de radio centrada en el átomo de carbono anomérico C₁ se les permitió moverse durante el proceso de optimización (la región activa contiene alrededor de 2100 átomos), mientras que el resto de átomos se mantuvieron fijos. La región QM incluye el anillo de fucosa, ocho moléculas de agua cercanas a éste y las cadenas laterales de Glu164, Glu338 y Tyr284 (67 átomos en total). Para definir la frontera QM-MM se usaron tres *link atoms* empleando un método de desplazamiento de carga³¹². La carga total de la región QM es de -1 u.a.

Las optimizaciones QM/MM se realizaron usando el algoritmo *limited-memory Broyden-Fletcher-Goldfard-Shanno* (L-BFGS)²⁶¹ en combinación con el *Hybrid Delocalized Internal Coordinate Scheme* (HDLCOpt)²⁶⁸. Los caminos de reacción se exploraron mediante optimizaciones que estaban restringidas de manera armónica a lo largo de una coordenada de reacción adecuada (ver más abajo) empleando pasos de 0.1 Å. Para cada perfil de energía potencial, se aproximó la correspondiente estructura de TS por la estructura que presentaba una mayor energía potencial.

5.3.2 Resultados para Ttb-gly *wild-type*

Como se ha explicado en la sección 5.3.1, el *snapshot* final de la simulación de MD a nivel MM se escogió como punto de partida para comenzar una simulación de MD a nivel QM(SCC-DFTB)/AMBER sin aplicar ninguna restricción. En primer lugar, el sistema se calentó dentro del colectivo canónico NVT aumentando la temperatura a lo largo de 60 pasos de 100 fs cada uno hasta alcanzar los 300 K. Entonces, se calculó un período de equilibración de 20 ps. En último lugar, se llevó a cabo un período de producción de 100 ps.

Con el objetivo de poder aplicar la ecuación 32, se han seleccionado $N = 2000$ *snapshots* uniformemente distribuidos en intervalos iguales a lo largo de dicha simulación de MD. Es importante notar que en la práctica, no es posible calcular los caminos de energía potencial de la hidrólisis correspondientes a estos N *snapshots*. Por esta razón, se han buscado las estructuras precatalíticas. Es evidente que únicamente serán precatalíticos aquellos *snapshots* que involucren una molécula de agua colocada en el lugar adecuado para que la reacción de hidrólisis sea posible, ya que éstos serán los únicos que impliquen una barrera de energía potencial razonable para la hidrólisis. De esta manera, se han buscado *snapshots* precatalíticos que cumplan que (ver Figura 38) una molécula de agua se encuentre con uno de sus átomos de hidrógeno más cerca de 2 Å respecto del átomo de oxígeno aceptor de protón (OE2_{GLU164}) de Glu164, con su átomo de oxígeno más cerca que cualquiera de sus átomos de hidrógeno respecto del átomo de carbono anomérico C₁ del anillo de fucosa. Según este filtro, únicamente se identificaron $n = 146$ *snapshots* precatalíticos. Se minimizó la energía de cada uno de éstos a nivel QM(SCC-

DFTB)/AMBER para obtener el mínimo reactivo asociado. A partir de estas estructuras, se calcularon los correspondientes caminos de energía potencial para la hidrólisis a nivel QM(SCC-DFTB)/AMBER utilizando como coordenada de reacción la diferencia entre la distancia $H_{\text{WAT}}-O_{\text{WAT}}$ y la distancia C_1-O_{WAT} (donde O_{WAT} es el átomo de oxígeno de la molécula de agua que se encuentra en el lugar adecuado para producir la reacción de hidrólisis y H_{WAT} es el átomo de hidrógeno de dicha molécula de agua que va a protonar a Glu164). Como era de esperar, se obtuvo una amplia dispersión de barreras de energía potencial, las cuales oscilan desde 20.9 kcal/mol a 31.8 kcal/mol. Dichas barreras de energía potencial presentan un promedio aritmético de 26.2 kcal/mol con una desviación estándar de 2.4 kcal/mol. Aunque estos valores son indicativos de la altura de las barreras y de su dispersión, no pueden ser utilizados para hacer una estimación de la barrera de energía de Gibbs.

Por otra parte, es interesante observar que el filtro utilizado conduce a 146 *snapshots* precatalíticos, los cuales presentan una distribución para la distancia C_1-O_{WAT} que está centrada alrededor del valor de 3.2 Å. Además, no existe correlación entre esta distancia C_1-O_{WAT} y las barreras de energía potencial. De igual manera, tampoco existe correlación entre la distancia correspondiente al protón que va a ser transferido con el átomo de oxígeno de Glu164 ($OE2_{\text{GLU164}}$) y las barreras de energía potencial, aunque en este caso se puede entrever una tendencia ligeramente alcista de las barreras cuando dicha distancia aumenta. En resumen, las distribuciones de las distancias C_1-O_{WAT} y $H_{\text{WAT}}-O_{\text{WAT}}$ son bastante estrechas para el conjunto de *snapshots* precatalíticos y no pueden explicar la considerable dispersión de barreras de energía potencial observada. Por lo tanto, se puede concluir que para esta reacción otros muchos parámetros geométricos del complejo de Michaelis tienen un papel fundamental en determinar dichas barreras y uno no puede centrarse exclusivamente en las distancias geométricas más relevantes desde un punto de vista de la reacción química.

Aplicando la ecuación 32, la contribución de las estructuras no precatalíticas (el primer término del segundo miembro de dicha ecuación) con $n = 146$ y $N = 2000$ a la barrera de energía de Gibbs es de 1.6 kcal/mol. La contribución de los 146 *snapshots* precatalíticos corresponde al promedio exponencial (el segundo término del segundo miembro de dicha ecuación) que resulta en 22.8 kcal/mol. En total, la barrera de energía de Gibbs asciende a 24.4 kcal/mol. Se puede ver claramente que la contribución de las estructuras no precatalíticas no es despreciable y que ésta aparece incluso en el caso de simulaciones de MD cortas (100 ps).

5.3.3 Resultados para el mutante Y284P Ttb-gly

Posteriormente, se ha estudiado la misma reacción enzimática, pero con barreras de energía sustancialmente más pequeñas, cosa que se ha logrado empleando el mutante Y284P Ttb-gly. Con este mutante se ha procedido de la misma manera que con Ttb-gly *wild-type*. Otra vez, se han seleccionado $N = 2000$ *snapshots* uniformemente distribuidos en intervalos iguales a lo largo de la simulación de MD a nivel QM(SCC-DFTB)/AMBER de 100 ps que se ha calculado sin aplicar ninguna restricción. Usando el mismo filtro que en la sección anterior, esta vez se han encontrado $n = 202$ *snapshots* precatalíticos. Se ha minimizado la energía de cada uno a nivel QM(SCC-DFTB)/AMBER para obtener los

mínimos reactivos asociados. A partir de estas estructuras, se han calculado los correspondientes caminos de energía potencial para la hidrólisis a nivel QM(SCC-DFTB)/AMBER usando como coordenada de reacción R2 la diferencia entre la distancia $H_{WAT}-O_{WAT}$ y la distancia C_1-O_{WAT} . Ahora, se obtiene una dispersión de barreras de energía potencial incluso más amplia, donde estas barreras oscilan desde 12.4 kcal/mol a 33.6 kcal/mol. Además, dichas barreras de energía potencial presentan un promedio aritmético de 23.1 kcal/mol con una desviación estándar de 4.7 kcal/mol.

Aplicando la ecuación 32, la contribución de las estructuras no precatalíticas (el primer término del segundo miembro de dicha ecuación) con $n = 202$ y $N = 2000$ a la barrera de energía de Gibbs es de 1.4 kcal/mol. La contribución de los 202 *snapshots* precatalíticos corresponde al promedio exponencial (el segundo término del segundo miembro de dicha ecuación) que resulta en 15 kcal/mol. En total, la barrera de energía de Gibbs asciende a 16.4 kcal/mol.

5.4 Reacciones de abstracción de hidrógeno del AA catalizadas por la 15-LOX-1 de conejo

En último lugar, se han estudiado dos reacciones enzimáticas donde las simulaciones de MD del complejo de Michaelis enzima-sustrato se han realizado a nivel MM y los correspondientes perfiles de energía potencial desde los *snapshots* seleccionados se han calculado a nivel QM(DFT)/MM. La utilización del nivel MM para las simulaciones de MD posibilita el cálculo de trayectorias miles de veces más largas que en el caso de Ttb-gly.

Como se ha comentado a lo largo de la introducción de la presente tesis, las LOXs son dioxigenasas que catalizan la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de manera regioespecífica y estereoespecífica, produciendo los ácidos grasos hidroperóxido conjugados. La etapa determinante de la velocidad del proceso global de hidroperoxidación es la abstracción de un átomo de hidrógeno inicial de una unidad 1,4-*Z,Z*-pentadieno de un ácido graso por parte del cofactor $Fe(III)-OH^-$ para producir un radical π -pentadienilo y el cofactor $Fe(II)-OH_2$ ^{56,320-323}.

La primera estructura cristalográfica de una LOX de mamífero en ser publicada fue el dímero de la 15-LOX-1 de reticulocito de conejo (*PDB code* 2P0M)³⁷. Dicha enzima convierte el AA, principal sustrato de las LOXs de mamífero, en HpETEs que presentan la siguiente distribución: 97% de 15(*S*)-HpETE (después de abstraer un átomo de hidrógeno del C_{13} del AA) y 3% de 12(*S*)-HpETE (después de abstraer un átomo de hidrógeno del C_{10} del AA). Cabe destacar que no se detectó señal de 9(*S*)-HpETE (después de abstraer un átomo de hidrógeno del C_7 del AA)³²⁴.

A lo largo de la presente sección, se van a estudiar las reacciones de transferencia de hidrógeno de los átomos de carbono C_{13} y C_7 del AA catalizadas por la 15-LOX-1 de conejo. Se ha escogido el caso de la abstracción de hidrógeno a partir del C_7 porque las barreras de energía que presenta dicha abstracción son muy elevadas y para nuestro propósito no importa que la abstracción de hidrógeno del C_7 sea demasiado lenta como para ser competitiva.

5.4.1 Detalles metodológicos para la enzima 15-LOX-1 de conejo

Se eliminaron el monómero A y el ligando unido al centro activo del monómero B de la estructura cristalográfica del dímero de 15-LOX-1 de conejo³⁷. Se protonó el monómero B con el servidor web H++^{246,247}, empleando un pH = 6.5 para los residuos titulables. El estado de protonación para la esfera de coordinación del átomo de hierro se corrigió a mano para asegurar una correcta descripción de ésta.

Se utilizó el programa GOLD5.8.0²⁴⁸ para realizar los cálculos de *docking* del AA dentro de la cavidad del monómero B. Se exploró el espacio conformacional utilizando GA. Se definió el lugar de unión como una esfera de 20 Å de radio centrada en el átomo de Fe. Se ha realizado una estimación de las energías de Gibbs de unión mediante la función *fitness* ChemScore.

Se seleccionó la mejor estructura para iniciar una simulación de MD. Para los átomos de proteína se usó el *force field* de AMBER ff14SB²⁵⁰, mientras que se recuperaron parámetros específicos para el AA de un trabajo previo³²⁵. Como fuente para estos parámetros se empleó la librería GAFF2^{249,251}. Se desarrollaron parámetros específicos MM para el átomo de Fe y su primera esfera de coordinación (His361, His366, His541, His545, Ile663 y el grupo OH)³⁸ empleado el procedimiento MCPB.py²⁵³ dentro del modelo enlazante y del método de Seminario para el cálculo de las constantes de fuerza²⁵⁴. Esta primera esfera de coordinación se optimizó empleando el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) y se asignaron sus cargas atómicas usando el procedimiento RESP de Merz y Kollman²⁵².

El programa tLeap se usó para combinar los archivos de enzima y sustrato, generando el complejo proteína-sustrato, y para solvatar dicho complejo con una caja ortorrómbica de moléculas de agua preequilibradas TIP3P²⁵⁵, además de para neutralizar su carga total por medio de la adición de cationes de sodio. El sistema final contiene aproximadamente 92150 átomos, de los cuales alrededor de 10600 pertenecen a la proteína. El resto de átomos corresponde a moléculas de agua y cationes de sodio. Todas las simulaciones de MD se realizaron usando la versión AMBER 14 GPU (CUDA) del paquete de programas PMEMD^{214,318}. Para comenzar, el complejo de Michaelis se sometió a 22000 pasos de minimización de energía combinado los métodos *steepest descent* y *conjugate gradient* para eliminar los malos contactos. En los primeros 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos de proteína y sustrato con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻², de manera que únicamente se relajó el solvente y los iones. En los siguientes 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos del esqueleto proteico y a los átomos pesados del sustrato con la misma constante de fuerza que antes. Sin embargo, durante los últimos 10000 pasos no se aplicó ninguna restricción a la totalidad del complejo. Después de esto, se llevaron a cabo simulaciones de MD usando PBC. El sistema se calentó gradualmente desde 0 K a 300 K durante un período de 200 ps. El siguiente paso consistió en realizar una simulación de MD de 1 ns dentro del colectivo NPT (300 K, 1 bar) para ajustar el volumen de la caja ortorrómbica de manera que la densidad del sistema estuviera alrededor de 1 g cm⁻³. Durante el calentamiento y la etapa isobárica, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos del esqueleto proteico y a los átomos pesados del sustrato con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻², mientras que el resto del sistema se mantuvo sin restricciones. Se controló la temperatura por

medio de la dinámica de Langevin²¹⁶, mientras que la presión se ajustó mediante el baróstato de Berendsen²¹⁷. A continuación, se llevó a cabo un período de equilibración de 10 ns a temperatura (300 K) y volumen constantes. En último lugar, se calculó un período de producción de longitud de 100 ns dentro del colectivo NVT. Se usó un *time step* de 2 fs a lo largo de toda la trayectoria de MD. Mediante el algoritmo SHAKE²¹⁵ se restringieron todos los enlaces y ángulos que contenían átomos de hidrógeno. Se han calculado las interacciones no enlazantes aplicando un *cutoff* de 9 Å.

Para describir la región QM se utilizó el funcional híbrido B3LYP²⁶⁹. Para los átomos de C, H, O y N se empleó el conjunto de base de People 6-31G(d)³²⁶, mientras que para el átomo de Fe se empleó el conjunto de base LANL2DZ²⁷⁰. La región QM (ver Figura 39) se definió como todos los átomos del AA que se encuentran entre C₅ y C₁₅, 11 átomos por cada His de la esfera de coordinación del Fe (His361, His366, His541 y His545), 3 átomos de la Ile terminal (Ile663) de la esfera de coordinación del átomo hierro y el cofactor Fe(III)-OH⁻. Se usó una multiplicidad de sextete³²⁷. La carga neta de la región QM es de 1 u.a. Se utilizaron siete *link atoms*, cinco entre los enlaces C α -átomos QM de los cinco residuos de la esfera de coordinación del Fe y dos enlazados a los átomos de carbono alifáticos del sustrato lipídico (colocados entre C₄-C₅ y C₁₅-C₁₆).

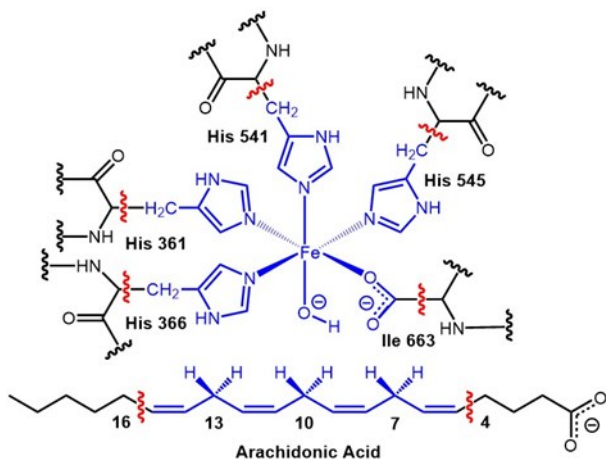


Figura 39. Partición QM/MM para las reacciones de abstracción de hidrógeno del AA catalizadas por la enzima 15-LOX-1 de conejo. Los átomos QM están representados en azul. La frontera entre las regiones QM y MM está indicada por líneas onduladas rojas.

5.4.2 Resultados para las reacciones de abstracción de hidrógeno del AA

Se han seleccionado $N = 10000$ *snapshots* uniformemente distribuidos en intervalos iguales a lo largo del período de producción que se ha descrito en la sección anterior. Posteriormente, se han identificado las estructuras precatalíticas que han sido definidas como aquellas donde la distancia inicial entre el átomo de hidrógeno que será abstraído, H_{13-proS} o H_{7-proS}, y el átomo de oxígeno aceptor de hidrógeno, es decir, el átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻, es menor que 3.0 Å o 4.0 Å, respectivamente. Además, en dichas estructuras, se cumple también que el átomo de hidrógeno a abstraer se encuentra bien orientado para su abstracción, es decir, se cumple $d(\text{H}_{13\text{-proS}}\text{-O}) \leq d(\text{C}_{13}\text{-O})$ o $d(\text{H}_{7\text{-proS}}\text{-O})$

$\leq d(\text{C}_7\text{-O})$ en función de la abstracción considerada, asegurando así que el correspondiente enlace C-H está adecuadamente orientado para que tenga lugar la abstracción de hidrógeno (ver Figura 39). En tales estructuras, la reacción se produce con una barrera de energía potencial razonable. Aplicando este filtro, únicamente se han identificado $n = 3383$ o $n = 33$ *snapshots* precatalíticos para las abstracciones de $\text{H}_{13\text{-proS}}$ o $\text{H}_{7\text{-proS}}$, respectivamente. De cada conjunto de *snapshots* precatalíticos, se han seleccionado de manera aleatoria 25 estructuras como representantes de dichos conjuntos. Se ha minimizado la energía de cada una a nivel QM(B3LYP)/AMBER para obtener los mínimos reactivos asociados. A partir de estas estructuras, se han calculado los correspondientes caminos de energía potencial a nivel QM(B3LYP)/AMBER empleando como coordenada de reacción la diferencia entre la distancia del enlace que se rompe ($\text{C}_{13}\text{-H}_{13\text{-proS}}$ o $\text{C}_7\text{-H}_{7\text{-proS}}$, para las abstracciones de $\text{H}_{13\text{-proS}}$ o $\text{H}_{7\text{-proS}}$, respectivamente) y la distancia del enlace que se forma ($\text{H}_{13\text{-proS}}\text{-O}$ o $\text{H}_{7\text{-proS}}\text{-O}$, respectivamente). Los correspondientes perfiles de energía potencial están representados en la Figura 40. De manera similar a los casos anteriores, se ha obtenido una amplia dispersión de barreras de energía potencial, las cuales oscilan de $12.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ a $26.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la abstracción de $\text{H}_{13\text{-proS}}$ (panel A de la Figura 40) y de $39.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ a 66 kcal mol^{-1} para la abstracción de $\text{H}_{7\text{-proS}}$ (panel B de la Figura 40). La abstracción de hidrógeno $\text{H}_{13\text{-proS}}$ presenta un promedio aritmético de $18.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ con una desviación estándar de $4.2 \text{ kcal mol}^{-1}$, mientras que la abstracción de hidrógeno $\text{H}_{7\text{-proS}}$ presenta un promedio aritmético de $49.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ con una desviación estándar de $6.3 \text{ kcal mol}^{-1}$. Conforme a lo previsto, las barreras de energía potencial correspondientes a la abstracción de $\text{H}_{13\text{-proS}}$ son bastante más pequeñas que las correspondientes a la abstracción de $\text{H}_{7\text{-proS}}$.

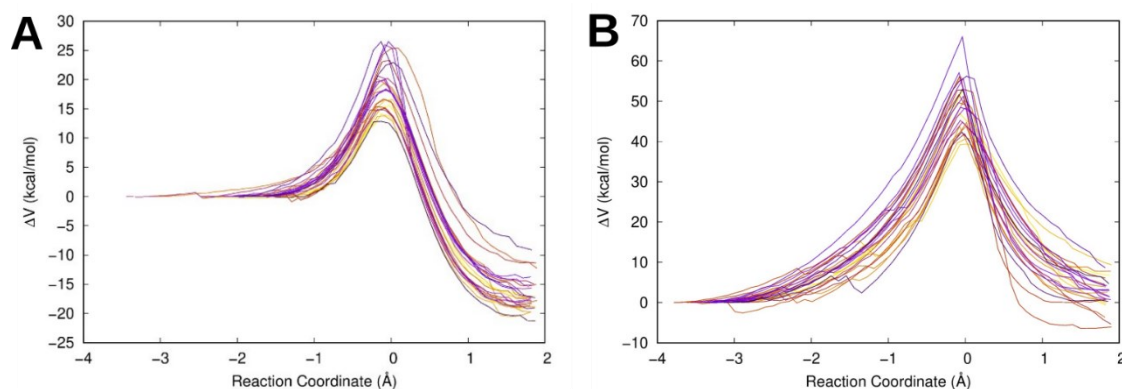


Figura 40. Caminos de energía potencial calculados comenzando a partir de cada uno de los 25 *snapshots* precatalíticos seleccionados de manera aleatoria para la reacción de abstracción de $\text{H}_{13\text{-proS}}$ (panel A) y $\text{H}_{7\text{-proS}}$ (panel B) catalizada por la enzima 15-LOX-1 de conejo.

Existe una dispersión bastante considerable de los valores de los parámetros geométricos relevantes para las reacciones de abstracción consideradas a lo largo de la simulación de MD de 100 ns. Esto se puede apreciar tanto siguiendo la evolución temporal de las distancias $\text{C}_{13}\text{-OH}$ y $\text{C}_7\text{-OH}$ (ver panel A de la Figura 41) como mirando los histogramas de estas distancias (ver panel B de la Figura 41). Ciertamente, aplicar el filtro correspondiente a los *snapshots* precatalíticos reduce enormemente esta dispersión

geométrica, aunque se sigue manteniendo la amplia dispersión de barreras de energía potencial y no se observa correlación con las distancias C₁₃-OH o C₇-OH (ver Figura 42).

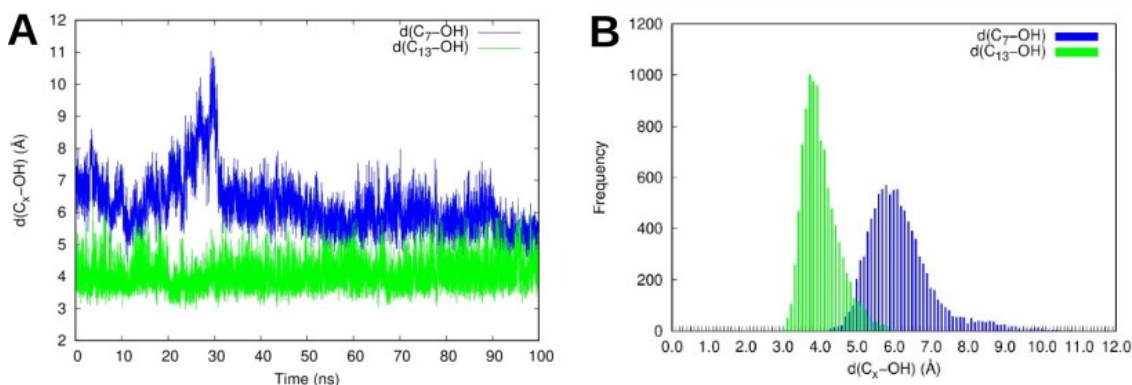


Figura 41. Distancias C₁₃-OH (en Å, línea verde) y C₇-OH (en Å, línea azul) (panel A) e histograma de las distancias C₁₃-OH (en Å, líneas verdes) y C₇-OH (en Å, líneas azules) (panel B) correspondientes a la simulación de MD de 100 ns a nivel MM(AMBER) para el complejo de Michaelis 15-LOX-1-AA. OH indica el grupo OH⁻ del cofactor Fe(III)-OH⁻ de la 15-LOX-1.

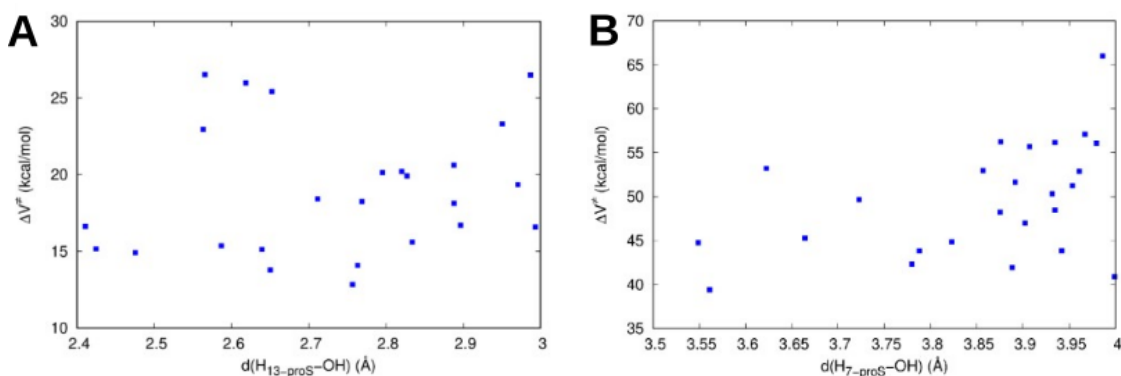


Figura 42. Barreras de energía potencial en función de las distancias H_{13-proS}-OH (panel A) o H_{7-proS}-OH (panel B) para los *snapshots* precatalíticos seleccionados de manera aleatoria en el caso de la enzima 15-LOX-1 de conejo. OH indica el grupo OH⁻ del cofactor Fe(III)-OH⁻ de la 15-LOX-1.

Aplicando la ecuación 32 para la abstracción de H_{13-proS}, la contribución de las estructuras no precatalíticas (el primer término del segundo miembro de dicha ecuación) con $n = 3383$ y $N = 10000$ a la barrera de energía de Gibbs es de 0.6 kcal mol⁻¹. Se puede hacer una estimación de la contribución de los *snapshots* precatalíticos a partir del promedio exponencial (segundo término del segundo miembro de dicha ecuación) incluyendo las 25 estructuras representativas seleccionadas aleatoriamente, resultando en 14.6 kcal mol⁻¹. En total, la barrera de energía de Gibbs asciende a 15.2 kcal mol⁻¹.

De manera similar para la abstracción de H_{7-proS}, el primer término da 3.4 kcal mol⁻¹, mientras que el segundo da 41.3 kcal mol⁻¹, resultando en una barrera de energía de Gibbs de 44.7 kcal mol⁻¹. La contribución de la energía de Gibbs correspondiente al primer término es el coste que se debe pagar para reducir el amplio conjunto de estructuras

correspondiente al complejo de Michaelis al conjunto estrecho de estructuras precatalíticas. Dicha contribución no se puede despreciar.

Tabla 3. Número de *snapshots* precatalíticos (n), número total de *snapshots* seleccionados (N), número de perfiles de energía potencial calculados, primer y segundo término de la ecuación 32, y ΔG^{\ddagger} para la abstracción de H_{7-proS} del AA catalizada por la enzima 15-LOX-1 de conejo para los diferentes fragmentos de la simulación de MD considerada.

Fragmento de simulación de MD considerado	Número de <i>snapshots</i> precatalíticos (n)	Número total de <i>snapshots</i> seleccionados (N)	Número de perfiles de energía potencial calculados	Primer término (kcal mol ⁻¹)	Segundo término (kcal mol ⁻¹)	ΔG^{\ddagger} (kcal mol ⁻¹)
De 0 ns a 50 ns	2	5000	2	4.6	47.4	52.0
De 50 ns a 100 ns	31	5000	23	3.0	41.2	44.2
De 0 ns a 100 ns	33	10000	25	3.4	41.3	44.7

Tabla 4. Número de *snapshots* precatalíticos (n), número total de *snapshots* seleccionados (N), número de perfiles de energía potencial calculados, primer y segundo término de la ecuación 32, y ΔG^{\ddagger} para la abstracción de H_{13-proS} del AA catalizada por la enzima 15-LOX-1 de conejo para los diferentes fragmentos de la simulación de MD considerada.

Fragmento de simulación de MD considerado	Número de <i>snapshots</i> precatalíticos (n)	Número total de <i>snapshots</i> seleccionados (N)	Número de perfiles de energía potencial calculados	Primer término (kcal mol ⁻¹)	Segundo término (kcal mol ⁻¹)	ΔG^{\ddagger} (kcal mol ⁻¹)
De 0 ns a 50 ns	1643	5000	14	0.6	14.2	14.8
De 50 ns a 100 ns	1740	5000	11	0.6	16.3	16.9
De 0 ns a 100 ns	3383	10000	25	0.6	14.6	15.2

Por otra parte, se ha realizado un test de convergencia de la barrera de energía de Gibbs y de sus contribuciones que aparecen en la ecuación 32 utilizando las reacciones de abstracción de hidrógeno que se han desarrollado en esta sección. Para lograr este propósito, se ha dividido la simulación de MD de 100 ns en dos mitades (50 ns cada una) y se han usado los resultados ya obtenidos para realizar un análisis de cada mitad por separado. De esta manera, cada mitad contiene un conjunto de $N = 5000$ *snapshots* uniformemente distribuidos en intervalos iguales a lo largo de la simulación de MD, los

snapshots precatalíticos correspondientes (n) y aquéllas de las 25 estructuras que fueron seleccionadas de manera aleatoria como representantes de los *snapshots* precatalíticos pertenecientes a cada mitad de trayectoria de 50 ns. Cabe destacar que para estas estructuras, ya se han calculado los caminos de energía potencial y las barreras de energía potencial correspondientes a nivel QM(B3LYP)/AMBER.

Las Tablas 3 y 4 muestran los resultados para las abstracciones de H_{7-proS} y H_{13-proS}, respectivamente. En aras de facilitar la comparación, los resultados para la totalidad de la simulación de MD también se han incluido en las últimas líneas de estas dos Tablas.

Es evidente que cuanto más largas son las simulaciones de MD, mejores son los resultados obtenidos. Se recomienda realizar este test para determinar si la barrera de energía de Gibbs y sus componentes están bien convergidos. Este test es bastante rápido porque solamente consiste en la comparación de la totalidad de resultados con la situación correspondiente a la división en dos mitades. En nuestro caso, los resultados están bastante bien convergidos, siendo los únicos resultados discordantes aquellos que corresponden a la simulación de 0 ns a 50 ns para la abstracción de H_{7-proS} (ver Tabla 3). Esto es debido a la estadística muy pobre que se obtiene cuando únicamente se encuentran 2 *snapshots* precatalíticos. De hecho, tendría que haber más *snapshots* precatalíticos (y, por lo tanto, más barreras de energía potencial calculadas) en una simulación de MD para obtener resultados fiables. Cabe reseñar que en el caso de la abstracción de H_{13-proS} (ver Tabla 4), la desviación más considerable aparece en el fragmento de MD que va de 50 ns a 100 ns, dentro del cual el número de perfiles de energía potencial calculados es un poco más pequeño en comparación con el primer fragmento o la totalidad de la simulación de MD.

Tabla 5. Número de *snapshots* precatalíticos (n), número total de *snapshots* seleccionados (N), número de perfiles de energía potencial calculados, primer y segundo término de la ecuación 32, y ΔG^{\ddagger} para las abstracciones de H_{7-proS} y H_{13-proS} del AA catalizadas por la enzima 15-LOX-1 de conejo para la totalidad de la simulación de MD aplicando un filtro más restrictivo para la búsqueda de *snapshots* precatalíticos.

Filtro de los <i>snapshots</i> precatalíticos	Número de <i>snapshots</i> precatalíticos (n)	Número total de <i>snapshots</i> seleccionados (N)	Número de perfiles de energía potencial calculados	Primer término (kcal mol ⁻¹)	Segundo término (kcal mol ⁻¹)	ΔG^{\ddagger} (kcal mol ⁻¹)
d(H _{7-proS} -OH) ≤ 3.8 Å y d(H _{7-proS} -OH) < d(C ₇ -OH)	12	10000	7	4.0	40.5	44.5
d(H _{13-proS} -OH) ≤ 2.7 Å y d(H _{13-proS} -OH) < d(C ₁₃ -OH)	1457	10000	9	1.1	14.9	16.0

Por otra parte, también se ha comparado nuestros resultados originales para los 100 ns de simulación de MD para las reacciones de abstracción de hidrógeno del AA catalizadas por la 15-LOX-1 de conejo, con los correspondientes resultados que se podrían haber obtenido usando un filtro ligeramente más restrictivo para identificar los *snapshots* precatalíticos. Los criterios originales eran $d(\text{H}_{7\text{-proS-OH}}) \leq 4.0 \text{ \AA}$ y $d(\text{H}_{7\text{-proS-OH}}) < d(\text{C}_7\text{-OH})$ para la abstracción de $\text{H}_{7\text{-proS}}$, y $d(\text{H}_{13\text{-proS-OH}}) \leq 3.0 \text{ \AA}$ y $d(\text{H}_{13\text{-proS-OH}}) < d(\text{C}_{13}\text{-OH})$ para la abstracción de $\text{H}_{13\text{-proS}}$. Los resultados en la Tabla 5 muestran que una restricción ligeramente más limitativa claramente disminuye, como era de esperar, el número de *snapshots* precatalíticos y altera los valores de los dos términos de la ecuación 32 (especialmente se aumenta la contribución del primer término), aunque el cambio de ΔG^{\ddagger} no es muy significativo. Sin embargo, el uso de un filtro bastante restrictivo podría reducir suficientemente el número de *snapshots* precatalíticos de manera que se perdiera la estadística necesaria para conseguir resultados fiables.

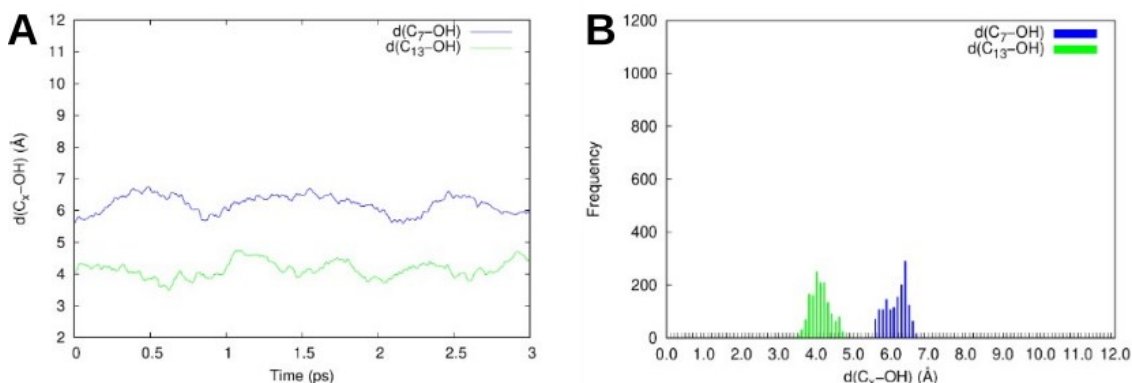


Figura 43. Distancias $\text{C}_{13}\text{-OH}$ (en Å, línea verde) y $\text{C}_7\text{-OH}$ (en Å, línea azul) (panel A) e histogramas de las distancias $\text{C}_{13}\text{-OH}$ (en Å, líneas verdes) y $\text{C}_7\text{-OH}$ (en Å, líneas azules) (panel B) correspondientes a la simulación de MD de 3 ps a nivel MM(AMBER) para el complejo de Michaelis 15-LOX-1-AA comenzando a partir de la estructura precatalítica seleccionada que da lugar a la barrera de energía potencial más baja para cada abstracción de hidrógeno. OH indica el grupo OH^- del cofactor Fe(III)-OH^- de la 15-LOX-1.

Merece la pena hacer una consideración final. Vamos a suponer que se realizan simulaciones de *Umbrella Sampling* (US) a partir de la estructura precatalítica seleccionada que da lugar a la barrera de energía potencial más baja para cada abstracción de hidrógeno. Es decir, la correspondiente a una barrera de $12.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la abstracción de $\text{H}_{13\text{-proS}}$ y la correspondiente a $39.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la abstracción de $\text{H}_{7\text{-proS}}$. Una amplitud razonable para las ventanas de las simulaciones de US a nivel QM(DFT)/MM en reacciones enzimáticas es de 3 ps (50 ps si se utiliza un método semiempírico para describir la región QM). La cuestión aquí es en qué grado las estructuras generadas a lo largo de esta exploración corta (la longitud de la cual está limitada por el gran tiempo de cálculo que involucran las simulaciones de MD a nivel QM/MM) son representativas de las configuraciones nucleares de la totalidad del valle de reactivos. En el panel A de la Figura 43 se ha representado la evolución de las distancias $\text{C}_{13}\text{-OH}$ y $\text{C}_7\text{-OH}$ a lo largo de una simulación de MD a nivel MM(AMBER)

de 3 ps del complejo de Michaelis 15-LOX-1-AA y los histogramas correspondientes aparecen en el panel B de la Figura 43. Esta Figura se debe comparar con la simulación de MD bastante más larga de 100 ns a nivel MM(AMBER) que aparece en la Figura 41. Es importante notar que las simulaciones cortas empleadas en las simulaciones de US únicamente cubren un entorno estrecho de la estructura de partida (sólo un subvalle), de tal manera que la contribución a la energía de Gibbs que proviene del gran número de configuraciones nucleares distribuidas en la totalidad del valle de reactivos se pierde totalmente. De esta manera, la elección de una única estructura particular para calcular la barrera de energía de Gibbs para una reacción enzimática usando o bien simulaciones de US o bien el método de FEP desprecia contribuciones muy considerables del valle de reactivos del complejo de Michaelis enzima-sustrato y puede conducir a un error significativo. Creemos que este capítulo 5 introduce un aviso significativo en este sentido que merece consideración.

5.5 Conclusiones

El *desorden instantáneo* consiste en fluctuaciones dinámicas instantáneas en el complejo de Michaelis enzima-sustrato que se producen en escalas de tiempo mucho menores que k_{cat} . Esto conduce a diferentes barreras de energía que no se pueden detectar experimentalmente, las cuales son consecuencia de un gran número de configuraciones nucleares en equilibrio local entre sí dentro de un valle de reactivos. Por medio de métodos QM/MM, se pueden construir múltiples caminos de mínima energía que conectan un mínimo de energía potencial dentro del valle de reactivos con el mínimo de energía potencial asociado en el valle de productos, produciendo una amplia dispersión de barreras de energía potencial. El método más empleado para hacer una estimación de la barrera de energía de Gibbs de una reacción enzimática ha sido el promedio exponencial. Sin embargo, es cuestionable la manera como se ha justificado y aplicado en la práctica dicho promedio exponencial. A lo largo de este capítulo 5 y sus secciones, se ha propuesto un protocolo basado en la teoría de *Free Energy Perturbation* que justifica de manera más idónea el uso adecuado del promedio exponencial que proporciona una manera práctica para determinar la barrera de energía de Gibbs de la reacción. Este valor incluye la contribución tanto de las estructuras no precatalíticas como de las precatalíticas como resultado de una larga exploración del valle de reactivos. Además, este procedimiento no requiere la elección arbitraria de una estructura particular en cuyo entorno bastante estrecho se calcula un potencial de fuerza media.

Capítulo 6

Estudio de las propiedades alostéricas del dímero de 15-LOX-1

Los resultados presentados a lo largo del capítulo 6 han sido publicados en los siguientes artículos:

International Journal of Molecular Sciences, vol. 22, 3285, pp. 1-18, **2022**

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, vol. 1865, 158680, pp. 1-14, **2020**

Journal of Medicinal Chemistry, vol. 65, pp. 1979-1995, **2022**

En esta sección se describe una parte de la tesis realizada en colaboración con los grupos experimentales del Dr. Harmut Kühn y Dr. Igor Ivanov. El autor de esta tesis ha tenido que entender y discutir los resultados experimentales, pero sólo ha efectuado directamente los cálculos teóricos, los cuales han sido diseñados en función de los resultados experimentales.

Dado que los resultados experimentales y teóricos son difícilmente inseparables, a continuación, se explican ambos, aunque la extensión de la parte experimental ha sido reducida al mínimo posible. Por otra parte, para facilitar la lectura, se han indicado las secciones que contienen exclusivamente resultados experimentales añadiendo en sus respectivos títulos la aclaración “(Resultados experimentales)”.

6.1 Introducción

Típicamente, se han considerado las isoformas de las LOXs como enzimas monoméricas que contienen una sola cavidad para la unión del sustrato, donde en dicha cavidad se

unen los ácidos grasos colocándose cerca del átomo de hierro catalíticamente activo que no pertenece a un grupo hemo.

En relación con la 15-LOX-1, es bien conocido que su especificidad de reacción depende de la geometría de las cadenas laterales de los aminoácidos Phe353, Met418, Ile419, Ile593 y Leu597, donde estos dos últimos residuos se encuentran en la parte final de la hélice $\alpha 18$. Dicha geometría determina la disposición del AA dentro del centro activo de la enzima^{37,328-330}. Por otra parte, experimentos cinéticos de la oxigenación de diferentes ácidos grasos catalizada por la 15-LOX-1 indican que la presencia de productos de las LOXs, tales como 15-HpETE, 12-HpETE y 13-HpODE, modula las constantes cinéticas de la oxigenación de AA y LA^{34,37,331-333}. Además, tal y como se explicará con más detalle más abajo, la potencia de varios inhibidores de la 15-LOX-1 depende de la identidad del ácido graso empleado para los ensayos de actividad^{334,335}. Todos estos datos no son congruentes con el mecanismo de reacción convencional de la 15-LOX-1 y sugieren mecanismos de carácter alostérico. Lamentablemente, la base molecular para las propiedades alostéricas de las diferentes isoformas de las LOXs no está clara, pero se han propuestos dos conceptos alternativos con el objetivo de explicarlas: 1) las isoformas de LOXs que tienen un carácter alostérico involucran, además de una cavidad donde se une el sustrato, un lugar de unión para los reguladores alostéricos. La unión de un ligando en este motivo estructural hipotético altera la estructura de la cavidad donde se une el sustrato, alterando también la cinética de oxigenación del sustrato^{28,336}; 2) las isoformas de LOXs que tienen un carácter alostérico funcionan como proteínas diméricas donde uno de los monómeros actuaría como regulador alostérico³³⁷. En este escenario, la cavidad del monómero regulatorio constituiría el lugar de unión para el ligando alostérico, mientras que el ácido graso se uniría en la cavidad del monómero catalítico.

La estructura cristalográfica de la 15-LOX-1 de conejo (*PDB code 2P0M*)³⁷ es congruente con una proteína heterodimérica, donde los dos confórmers estructuralmente diferentes A (con el centro activo vacío) y B (con el centro activo ocupado por el inhibidor RS7), interaccionan el uno con el otro por medio de sus hélices $\alpha 2$ y $\alpha 18$. Como se ha comentado en la sección 1.2.2.1, dicho heterodímero se estabiliza fundamentalmente por la formación de un clúster hidrofóbico, que presenta una conformación *zipper* en la estructura cristalográfica, donde Leu179/Leu183 de la hélice $\alpha 2$ del confórmer A y Leu188/Leu192 de la hélice $\alpha 2$ del confórmer B entran en contacto directo entre sí. En el confórmer B, que tiene unido el ligando RS7, la hélice $\alpha 2$ se encuentra desplazada alrededor de 12 Å cuando se compara con su homóloga del confórmer A, que se encuentra vacía, mientras que la hélice $\alpha 18$ del confórmer B sólo se encuentra ligeramente desplazada respecto su homóloga del confórmer A³³⁸. Además, cálculos de energía de Gibbs de la dimerización de la 15-LOX-1 de conejo sugieren que entre todos los posibles dímeros de 15-LOX-1 (A+A, A+B y B+B) la combinación A+B es la más estable desde un punto de vista termodinámico³⁵. Aunque, en general, en solución acuosa los elementos de la estructura secundaria presentan una mayor flexibilidad que cuando están formando cristales³⁵, la 15-LOX-1 de conejo también experimenta dimerización reversible en estas condiciones. Este equilibrio monómero-dímero depende del pH, de la concentración de sal, de la presencia o ausencia de ligandos en el centro activo, de la concentración de enzima y de la temperatura. De hecho, la unión de un ligando en el centro activo favorece la dimerización de dicha enzima³⁴. Cabe destacar que cálculos de *docking* de AA y LA en la

cavidad del conformero A resultan en complejos enzima-sustrato inestables (resultados no publicados) y sugieren que la reorganización de la hélice $\alpha 18$ puede ser necesaria para proporcionar suficiente espacio para la unión del ácido graso. Sin embargo, la fuerza motriz para la reorganización de la hélice $\alpha 2$ no está clara. Debido a que el equilibrio monómero-dímero también se ha observado para la enzima que no contiene ningún ligando, puede ser posible que la 15-LOX-1 de conejo en solución acuosa esté presente en dos estados conformacionales, que difieren el uno del otro en la localización de sus hélices $\alpha 2$. En base a los datos disponibles actualmente, no se puede decidir si el desplazamiento de la hélice $\alpha 2$ es forzado por la unión de RS7 o si la flexibilidad intrínseca de la hélice $\alpha 2$ permite la unión de RS7. Bien podría ser que dicha flexibilidad de la hélice $\alpha 2$ permitiese la unión de ligandos voluminosos en el centro activo. No obstante, cuando se solapan las estructuras cristalográficas de la 15-LOX-1 de conejo³⁷ (conformero A) y de la 15-LOX-2 humana que contiene un ligando³³⁹ (panel A de la Figura 44), y la de esta primera enzima y la del dominio catalítico de la 12-LOX porcina de los leucocitos³⁴⁰, que también contiene un ligando, (panel B de la Figura 44) se puede observar que la posición relativa de la hélice $\alpha 2$ es muy similar. En estudios previos, se ha indicado que una fuerte asociación en la 15-LOX-1 de conejo del dominio PLAT con la subunidad catalítica puede ser importante para la estabilidad e integridad de la hélice $\alpha 2$ ³²⁸. Además, los experimentos (espectrometría de masas de intercambio hidrógeno deuterio) en la 15-LOX-2 humana también sugieren que la unión del sustrato puede inducir alteraciones en la dinámica estructural del dominio PLAT y de la hélice $\alpha 2$ ³⁴¹. De manera que la conformación observada de la hélice $\alpha 2$ en el conformero B de la 15-LOX-1 de conejo puede no ser considerada como *non-native structure* sino ser una consecuencia del alto grado de flexibilidad estructural del dominio catalítico.

Para explorar la dinámica conformacional de los monómeros de 15-LOX-1 y la posibilidad de su cooperación funcional en más detalle, nuestros colaboradores experimentales analizaron (por medio de *native polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE)) las enzimas altamente purificadas 15-LOX-1 de conejo y 15-LOX-2 humana. Cuando estas preparaciones de las enzimas (que mostraron una sola banda proteica en *sodium dodecyl sulfate native polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)), se analizaron en condiciones nativas se detectaron dos bandas proteicas bien separadas y estos datos sugirieron la heterogeneidad estructural de las preparaciones de las enzimas. Cuando se mutan residuos claves que contribuyen a las interacciones intermonómero se observan alteraciones en las propiedades catalíticas.

Por otra parte, el extremo C-terminal de la hélice $\alpha 18$ contiene en la posición 596 el residuo Gln que se conserva en numerosas 15-LOX de mamíferos, pero en la 12-LOX humana de las plaquetas esta posición está ocupada por una His. Recientemente, se ha determinado que la His596 de la 12-LOX humana de las plaquetas está implicada en la unión del sustrato, ya que puede interactuar con el grupo carboxilato del AA durante la catálisis³²⁹. A diferencia de la His, que posee una carga positiva a pH fisiológico, la cadena lateral de Gln no está cargada, pero puede interactuar con el grupo carboxilato del sustrato mediante la formación de puentes de hidrógeno, ya sea formándolos directamente o utilizando moléculas de agua de puente. Para ambos residuos (His y Gln) se han determinado valores similares de energía de Gibbs de solvatación.

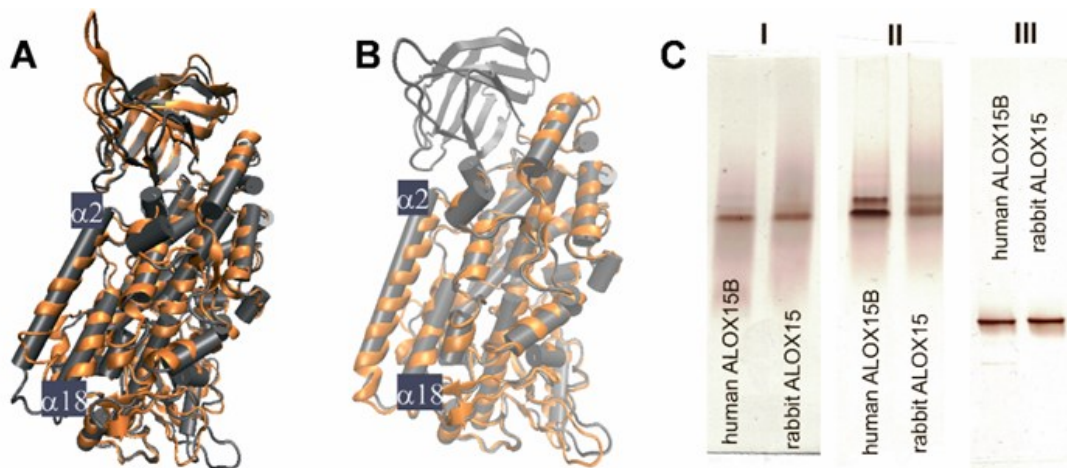


Figura 44. Solapamiento de las estructuras cristalográficas de la 15-LOX-1 (ALOX15) de conejo (*PDB code* 2P0M³⁷, conformero A, gris) y de la 15-LOX-2 (ALOX15B) humana (*PDB code* 4NRE³³⁹, marrón) (panel A); Solapamiento de las estructuras cristalográficas de la 15-LOX-1 de conejo (*PDB code* 2P0M³⁷, conformero A, gris) y del dominio catalítico de la 12-LOX porcina de los leucocitos (*PDB code* 3RDE³⁴⁰, marrón) (panel B); Heterogeneidad estructural de la 15-LOX-1 de conejo y de la 15-LOX-2 humana en soluciones acuosas (panel C). PAGE en condiciones nativas. Para este análisis, las enzimas se prepararon y mantuvieron en un buffer 20 mM de tris(hidroximetil) aminometano hidrocloreuro (Tris-HCl) de pH 8.0 que contenía 130 mM de NaCl (C-I). PAGE en condiciones nativas. Para este análisis, las enzimas se prepararon y mantuvieron en un buffer 20 mM de Tris-HCl de pH 8.0 que no contenía NaCl (preparación de la enzima sin sal eluida como un solo pico mediante cromatografía por exclusión de tamaño) (C-II). PAGE en condiciones de desnaturalización. Para este análisis, las enzimas se prepararon y mantuvieron en un buffer 20 mM de Tris-HCl de pH 8.0, pero el buffer utilizado para realizar la prueba experimental contenía 0.5% de *sodium dodecyl sulfate* (SDS) (C-III).

Para explorar si la Gln596 de las 15-LOXs de mamíferos está involucrada en las interacciones enzima-sustrato o si este residuo puede contribuir a las propiedades alostéricas de estas enzimas primero nuestros colaboradores experimentales mutaron Gln596 de la 15-LOX-1 de conejo y Gln595 de la 15-LOX-2 humana por aminoácidos hidrofóbicos que no pueden establecer puentes de hidrógeno (más concretamente Leu y Ala). Luego testearon las alteraciones estructurales y funcionales para los mutantes resultantes. A continuación, insertaron una Pro, un aminoácido que se caracteriza por romper las hélices α , y una Glu, que está cargada negativamente, en esta posición y comprobaron el impacto de estos intercambios de aminoácidos en la funcionalidad de las enzimas. En último lugar, diseñamos *in silico* nuevos modelos diméricos para la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y sus mutantes del residuo Gln596, en los cuales el conformero A está representado por un monómero vacío (no hay ligando en su centro activo) y el conformero B contiene o bien el AA o bien el 19-HETE en su centro activo.

Finalmente, en relación con el papel de 15-LOX-1 en la inflamación, es preciso destacar que dicha enzima es algo peculiar, ya que exhibe una funcionalidad dual³⁴². En varios modelos inflamatorios, los productos de la 15-LOX-1 inducen efectos proinflamatorios. En cambio, también hay artículos que sugieren actividades antiinflamatorias de la 15-

LOX-1. Este hecho complica el desarrollo de inhibidores de ésta con el objetivo de tratar diversas enfermedades humanas³⁴³⁻³⁴⁵. Gran cantidad de los inhibidores que se han desarrollado para 15-LOX-1 en el pasado involucran heterociclos que contienen nitrógeno. Entre éstos se encuentran los muy potentes derivados de oxadiazol o oxazol³⁴⁶, las sulfonamidas y sulfamidas basadas en pirazol³⁴⁷, los análogos sulfonamida basados en imidazol³⁴⁸, los inhibidores basados en indol³⁴⁹⁻³⁵², además de las sulfonamidas triptaminas³⁵³. La mayoría de estos compuestos inhiben la oxigenación del LA catalizada por la 15-LOX-1 con una eficiencia similar a la del AA³⁴⁸⁻³⁵³. Sin embargo, la potencia inhibitoria de algunos de estos compuestos depende del ácido graso, cosa que puede tener relevancia biológica. De hecho, los inhibidores de la 15-LOX-1 que muestran especificidad en relación con el sustrato pueden dificultar la formación de los mediadores nocivos derivados del LA sin alterar la biosíntesis de moléculas señalizadoras beneficiosas que provienen de otros ácidos grasos poliénoicos. Cuando se probó el *isobutyl (N-(5-(5,6-difluoro-1H-indol-2-yl)-2-methoxyphenyl)sulfamoyl)carbamate*³⁵⁰ como inhibidor de la 15-LOX-1 humana purificada, se observó inhibición selectiva de la actividad oxigenasa del LA de la enzima con un ratio $IC_{50}(LA)/IC_{50}(AA)$ de 0.03 (ver Figura 45). La diferencia observada entre sustratos no se puede explicar mediante el modelo convencional de unión de un ligando³⁵⁴, en el cual inhibidor y sustrato compiten por unirse al centro catalítico de la enzima monomérica, cosa que sugiere que dicha enzima tiene un carácter alostérico.

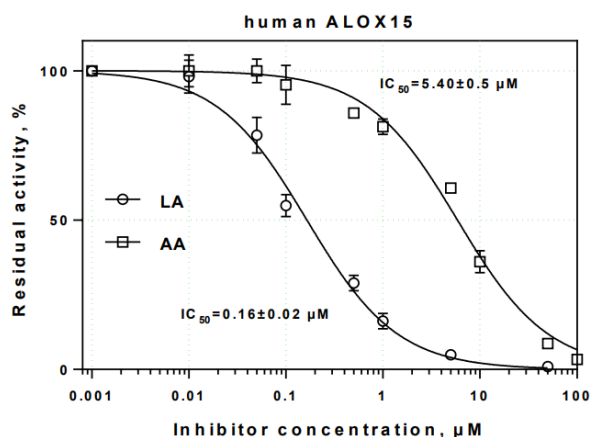


Figura 45. Curvas dosis-respuesta para la inhibición de la actividad oxigenasa de LA y AA catalizada por la 15-LOX-1 humana pura por medio de *isobutyl (N-(5-(5,6-difluoro-1H-indol-2-yl)-2-methoxyphenyl)sulfamoyl)carbamate*.

Para explorar la base molecular de la inhibición específica de sustrato de la actividad oxigenasa del LA de la 15-LOX-1 por medio de *isobutyl (N-(5-(5,6-difluoro-1H-indol-2-yl)-2-methoxyphenyl)sulfamoyl)carbamate*³⁵⁰, primero de todo hemos realizado estudios *in silico* basados en cálculos de *docking* para encajar dicho compuesto en el lugar de unión del sustrato de la 15-LOX-1. Ya que actualmente no se dispone de ninguna estructura cristalográfica para la 15-LOX-1 humana, nuestros colaboradores experimentales han realizado la mayoría de los experimentos mecanísticos con la 15-LOX-1 de conejo. Después de los estudios de *docking* iniciales, seleccionaron el *(N-(3-(1H-indol-2-yl)phenyl)sulfamoyl)carbamate* como núcleo farmacóforo, prepararon un conjunto de

análogos modificados y probaron sus actividades en relación con las 15-LOXs de conejo, humana y de ratón recombinado. Teniendo en cuenta que en trabajos previos se determinó que el *docking* del AA en el centro activo del conformero A de la 15-LOX-1 de conejo resultaba en un complejo enzima-sustrato inestable (resultados no publicados), hemos empleado un nuevo modelo de dímero para la 15-LOX-1 de conejo, en el cual el lugar de unión del ligando del conformero A está ocupado por el inhibidor, mientras que el conformero B contiene el ácido graso correspondiente en su centro catalítico. Por último, hemos realizado estudios de mutagénesis *site-directed* y simulaciones de MD para explorar las consecuencias de la unión del inhibidor en el alineamiento del sustrato en el centro activo del otro monómero.

En lo que resta de este capítulo 6 se van a ir detallando los experimentos realizados más destacados, así como sus resultados y conclusiones principales, pero no se va a entrar en la metodología de estos experimentos porque, como se ha comentado más arriba, éstos no han sido realizados por nuestro grupo de investigación, sino que han sido fruto de una colaboración con dos grupos de investigación extranjeros (Dr. Harmut Kühn y Dr. Igor Ivanov).

6.2 Heterogeneidad conformacional y efectos cooperativos de la de la 15-LOX de mamífero

6.2.1 Metodología

En relación con los cálculos de *docking*, se realizaron con el programa GOLD5.8.0²⁴⁸. Las coordenadas para los átomos de hidrógeno se generaron con el servidor web H++^{246,247} empleando un pH de 6.0 para los residuos titulables. Los cálculos de *docking* de AA y LA se realizaron colocando dichos ácidos grasos en la cavidad de una estructura relajada del conformero B del dímero Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-*empty*(B). Es preciso destacar que este dímero mutante de la 15-LOX-1 de conejo se creó basándose en las coordenadas de la estructura cristalográfica de dicha enzima *wild-type* (*PDB code* 2P0M)³⁷. Para poder llevar a cabo lo anterior, se eliminó el ligando (inhibidor RS7) que ocupaba el centro activo del conformero B. En estos estudios de *docking*, la cavidad donde se podía unir el sustrato se definió como una esfera de 20 Å de radio centrada alrededor del átomo de hierro catalítico que no pertenece a un grupo hemo del conformero B. La estructura de la enzima se mantuvo totalmente rígida durante los cálculos de *docking*, sin embargo, se les confirió total flexibilidad a los diferentes ácidos grasos. Se activó la opción de GOLD que considera las interacciones de ligandos orgánicos con iones metálicos en metaloenzimas, pero limitando la exploración de los cálculos de *docking* a geometrías hexacoordinadas del hierro. Con el objetivo de asegurar una exploración conformacional extensiva de los diferentes sustratos se empleó el algoritmo genético más eficiente. Para hacer una estimación de las energías de Gibbs de unión de los sustratos se seleccionó la función *fitness* ChemScore.

En relación con las simulaciones de MD, primero de todo, utilizando el protocolo establecido por el paquete de programas AMBER²⁴⁹, se montaron los modelos diméricos W181E-15-LOX-1-*empty*(A)-*empty*(B), W181E-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) y W181E-

15-LOX-1-*empty*(A)-LA(B). El *force field* ff14SB²⁵⁰ se utilizó para la proteína, mientras que los parámetros del *force field* para el átomo de hierro y su esfera de coordinación³⁸ (His361, His366, His541, His545, Ile663 y el grupo OH⁻) se desarrollaron empleado el procedimiento MCPB.py²⁵³. Para los dos sustratos (AA³²⁵ y LA³⁵⁵) se recuperaron sus parámetros de *force field* de estudios previos empleando el protocolo de AMBER. Como fuente de estos parámetros se utilizó la librería GAFF2^{250,251}. Los grupos carboxilato de los dos sustratos se modelaron como no protonados para que coincidan con su estado de protonación en condiciones fisiológicas. Usando el programa tLeap se solvataron los diferentes complejos con una caja ortorrómbica de aguas preequilibradas TIP3P²⁵⁵ y la carga total se neutralizó con cationes sodio. Los sistemas finales contenían alrededor de 200000 átomos, donde unos 21000 pertenecían a la proteína. El resto de átomos eran moléculas de agua y cationes sodio. Todas las simulaciones de MD se calcularon empleando la versión AMBER 18 GPU (CUDA) del paquete de programas PMEMD^{214,256}. En primer lugar, los sistemas se minimizaron usando los algoritmos *steepest-descent* y *conjugate gradient* durante 22000 pasos de minimización de energía para evitar malos contactos. En los primeros 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos de la proteína y del sustrato con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻². En los siguientes 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas únicamente al esqueleto proteico y a los átomos pesados del sustrato con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻². En los últimos 10000 pasos, la totalidad del sistema se encontraba libre de restricciones. Después, se llevaron a cabo las simulaciones de MD utilizando PBC. El sistema se calentó gradualmente de 0 K a 300 K durante un período de 200 ps. A continuación, se realizó una simulación de MD de 1 ns a temperatura y presión constantes (300 K, 1 bar) para ajustar el volumen de la caja de manera que la densidad del sistema fuese cercana a 1 g cm⁻³. Cabe destacar que durante la etapa de calentamiento y la etapa isobárica se aplicaron restricciones armónicas al esqueleto proteico y a los átomos pesados del sustrato con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻². La temperatura se controló por medio de dinámica de Langevin²¹⁶, mientras que la presión se ajustó mediante el baróstato de Berendsen²¹⁷. Posteriormente, se llevó a cabo una etapa de equilibración de 10 ns a temperatura (300 K) y volumen constantes. En último lugar, se generó un período de producción de 100 ns dentro del mismo colectivo isotérmico-isocórico. Se empleó un *time step* de 2 fs a lo largo de toda la trayectoria de MD. Todos los enlaces y ángulos que contienen átomos de hidrógeno se fijaron por medio del algoritmo SHAKE²¹⁵. Las interacciones no enlazantes se han calculado con un *cutoff* de 9 Å. Entonces, la última estructura de la simulación de MD para el dímero Trp181Glu-15-LOX-*empty*(A)-*empty*(B) se utilizó como receptor para los cálculos de *docking* de AA y LA en el monómero B. A continuación, la mejor pose de *docking* del AA se seleccionó como la estructura de partida para las simulaciones de MD del complejo Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) y la mejor pose de *docking* del LA se empleó para iniciar la simulación de MD del complejo Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-LA(B). Con el objetivo de poder comparar, se han incluido también los resultados de las simulaciones de MD para los complejos diméricos 15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) *wild-type* y 15-LOX-1-*empty*(A)-LA(B) *wild-type* de estudios previos realizados por nosotros³⁸. Los análisis de las simulaciones de MD se realizaron con AmberTools18, mientras que la visualización de dichas trayectorias se realizó con los programas VMD²⁷⁶ y USCF CHIMERA²⁷⁷.

6.2.2 Resultados

6.2.2.1 Caracterización estructural de las isoenzimas de 15-LOX mediante PAGE en condiciones nativas (Resultados experimentales)

Para explorar la heterogeneidad estructural de las diferentes isoformas de las LOXs en solución acuosa se han seleccionado dos isoenzimas de las LOXs (la 15-LOX-1 de conejo y la 15-LOX-2 humana), para las cuales se ha resuelto su estructura cristalográfica (*PDB codes* 2P0M³⁷ y 4NRE³³⁹, respectivamente). Estas enzimas se han expresado, purificado y analizado por medio de diferentes tipos de PAGE. Los resultados experimentales sugieren que en soluciones acuosas libres de sal tanto la 15-LOX-1 de conejo como la 15-LOX-2 humana presentan heterogeneidad estructural (por lo menos dos conformeros diferentes), mientras que la presencia de sal induce homogeneidad estructural en ambas isoformas (ver panel C de la Figura 44).

6.2.2.2 Consecuencias de la eliminación del dominio N-terminal y de mutaciones puntuales de His585 en la heterogeneidad conformacional de la 15-LOX-1 de conejo (Resultados experimentales)

Con el objetivo de explorar la base estructural de la heterogeneidad estructural de la 15-LOX-1 observada (ver panel C parte II de la Figura 44) se han llevado a cabo tres líneas de experimentos adicionales: 1) se preparó, purificó y analizó por medio de PAGE en condiciones nativas el mutante catalíticamente activo que no contenía el dominio N-terminal PLAT dado que dicho dominio se ha relacionado con la heterogeneidad estructural de la 15-LOX-1 de conejo^{31,35}. De manera similar, tanto para la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* como para su mutante que no contenía el dominio N-terminal PLAT se observaron dobles bandas proteicas, sugiriendo que la heterogeneidad estructural de ambas proteínas no guarda relación con la flexibilidad del dominio N-terminal PLAT relativa a la subunidad catalítica. De manera que dicha heterogeneidad estructural es una propiedad intrínseca del dominio catalítico; 2) se repitió la experiencia anterior a diferentes valores de pH. Entonces, se pudo observar que esta doble banda seguía apareciendo para ambas proteínas, pero las intensidades de las bandas dependían del pH; 3) se llevaron a cabo varios estudios de mutagénesis de residuos que potencialmente son relevantes para la formación del dímero³⁴. De acuerdo con el análisis *Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies* (PISA), la His585 del conformero A que pertenece a la hélice $\alpha 18$ y el Trp181 del conformero B que pertenece a la hélice $\alpha 2$ contribuyen significativamente al plano de contacto intermonómero en la estructura cristalográfica de la 15-LOX-1 de conejo. En estado monomérico, ambos conformeros tienen el Trp181 expuesto al solvente.

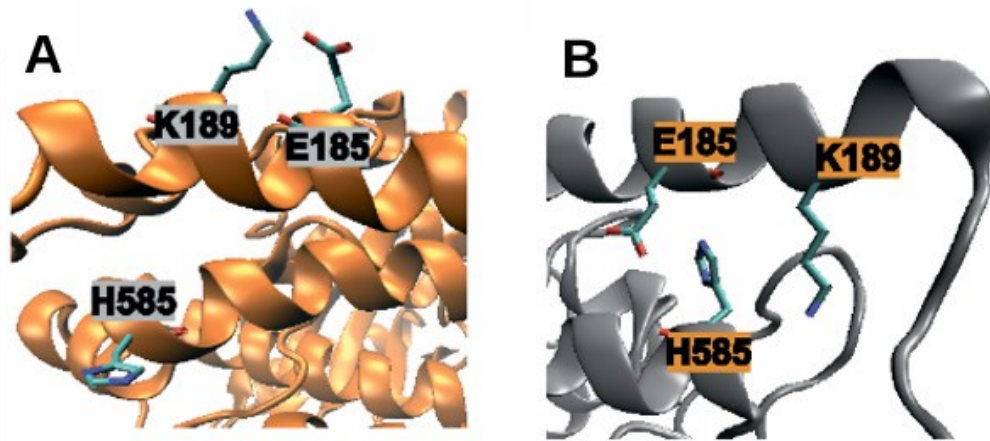


Figura 46. Estructura cristalográfica del conformero A (no hay ligando unido en el centro activo) para la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* (panel A) donde la cadena lateral de His585 se encuentra en la superficie de la proteína y es accesible al solvente. Estructura cristalográfica del conformero B (hay ligando unido en el centro activo) para la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* (panel B) donde la cadena lateral de His585 no es accesible al solvente, ya que está ocultada dentro de la proteína entre las cadenas laterales de Glu185 y Lys189.

En cambio, la His585 únicamente está expuesta al solvente en el estado monomérico del conformero A (ver panel A de la Figura 46), mientras que en el conformero B la cadena lateral de este residuo está apantallada por la hélice $\alpha 2$ del mismo conformero (ver panel B de la Figura 46). La introducción de un Glu, que está cargado negativamente, en esta posición (mutación His585Glu) es probable que induzca repulsiones electrostáticas entre las cadenas laterales de Glu185 y Glu585 que también están cargadas negativamente. Estas fuerzas repulsivas podrían afectar la disposición espacial de las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 18$. Por otra parte, la Glu585 cargada negativamente podría interactuar con la Lys189 cargada positivamente. Estas fuerzas electrostáticas atractivas podrían estabilizar la estructura de este conformero. Por todo esto, es difícil predecir las consecuencias funcionales de tales mutaciones. Cuando se introduce una Lys cargada positivamente en la posición 585 (mutación His585Lys) se esperan escenarios similares a los que se acaban de comentar. Por medio de cromatografía por exclusión de tamaño se ha podido determinar que, bajo las condiciones experimentales empleadas, las fracciones de proteína preparadas (15-LOX-1 de conejo *wild-type* y los mutantes de la posición 585) se encuentran en forma monomérica (ver Figura 47). El análisis de estos mutantes mediante PAGE en condiciones nativas indica que el residuo que se encuentra en la posición 585 contribuye a la carga neta superficial de la proteína. Además, mediante espectroscopia de dicroísmo circular (CD) a diferentes temperaturas también se exploró el impacto de la mutación His585Glu en la estructura proteica donde los resultados obtenidos sugirieron que Glu585 podría desempeñar un papel en la estabilidad de la proteína. Por otra parte, los espectros de fluorescencia de la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y de sus mutantes His585Glu y Trp181Glu eran muy similares entre sí, cosa que sugirió que estas tres variantes enzimáticas presentan una estructura terciaria muy similar. En último lugar, los experimentos de desnaturalización con cloruro de guanidinio (GdnHCl) indicaron que

el mutante His585Glu puede estar inicialmente presente en un estado fundamental más hidratado que la enzima *wild-type*.

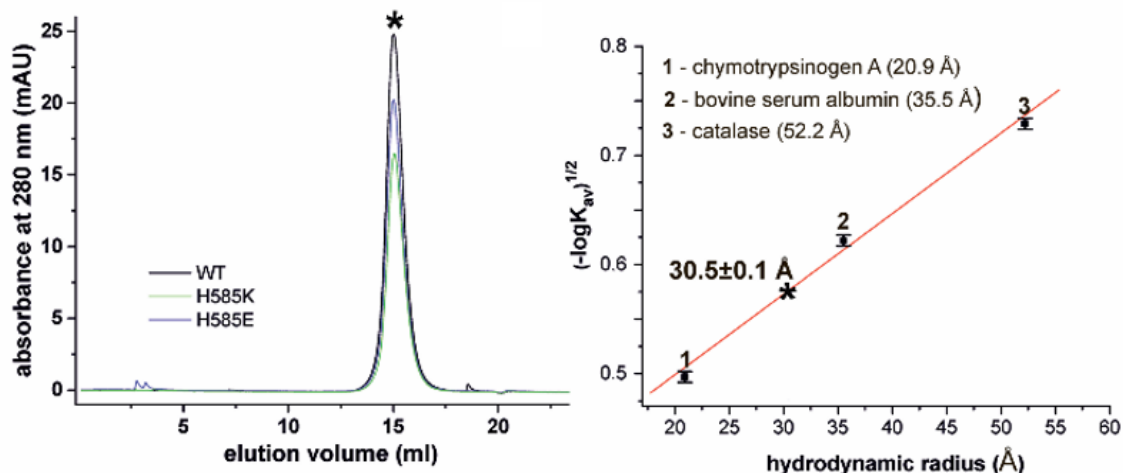


Figura 47. Cromatografía por exclusión de tamaño (gráfico de la izquierda) de la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y de sus mutantes His585Lys y His585Glu, la cual se realizó en un buffer 20 mM de Tris-HCl. Los volúmenes de elución de estas enzimas se han señalado con un asterisco. Se estimó el radio hidrodinámico de dichas enzimas usando diferentes proteínas de calibración (gráfico de la derecha).

6.2.2.3 Impacto de mutaciones puntuales de aminoácidos localizados en la interfase en la cinética de reacción de la 15-LOX-1 de conejo (Resultados experimentales)

Estudios de mutagénesis previos combinados con medidas de *Small-angle X-ray scattering* (SAXS) sugieren la importancia del clúster de leucinas y de las cadenas laterales de Trp181 y His585 para la dimerización de la 15-LOX³⁴. Para explorar la contribución individual de Trp181 y His585 al carácter alostérico de la 15-LOX, se expresaron y purificaron la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y los correspondientes mutantes que contenían una única mutación (Trp181Glu y His585Glu). Posteriormente, se evaluaron sus propiedades catalíticas utilizando a AA y LA como sustratos.

Tabla 6. Actividades catalíticas de la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y los mutantes seleccionados.

Enzima	LA			AA		
	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu M^{-1}$)
<i>Wild-type</i>	47.2 ± 2.8	21.4 ± 1.3	2.2 ± 0.1	11.3 ± 0.6	8.1 ± 0.4	1.4 ± 0.2
His585Glu	21.2 ± 3.1	19.8 ± 2.9	1.1 ± 0.2	15.8 ± 0.9	4.9 ± 0.3	3.2 ± 0.1
Trp181Glu	39.8 ± 6.2	24.7 ± 3.9	1.6 ± 0.2	54.4 ± 2.0	6.6 ± 0.4	8.3 ± 0.5

Como se puede apreciar en la Tabla 6, la oxigenación de los dos sustratos sigue una cinética de Michaelis-Menten y se calcularon para la 15-LOX-1 de conejo unos valores de K_M de $21.4 \pm 1.3 \mu\text{M}$ y $8.1 \pm 0.4 \mu\text{M}$ para el LA y el AA, respectivamente. La actividad catalítica máxima para la oxigenación del LA (k_{cat}) era cuatro veces más grande que para la oxigenación del AA, pero las eficiencias catalíticas de oxigenación (k_{cat}/K_M) del LA y del AA eran muy similares entre sí. Estos datos cinéticos están de acuerdo con resultados previamente publicados³⁵⁶. La introducción de un residuo cargado negativamente en la posición 585 (His585Glu) reduce la eficiencia catalítica para la oxigenación del LA, pero apenas altera la afinidad de sustrato de la enzima. En relación con el AA, dicha mutación indujo un aumento de 2.5 veces en la eficiencia catalítica de oxigenación, convirtiendo al AA en un mejor sustrato que el LA (Tabla 6, Figura 48). Por otra parte, la mutación Trp181Glu casi no tuvo ningún efecto en los parámetros de oxigenación del LA, mientras que para el AA se observó un aumento de 5 veces en su eficiencia catalítica de oxigenación.

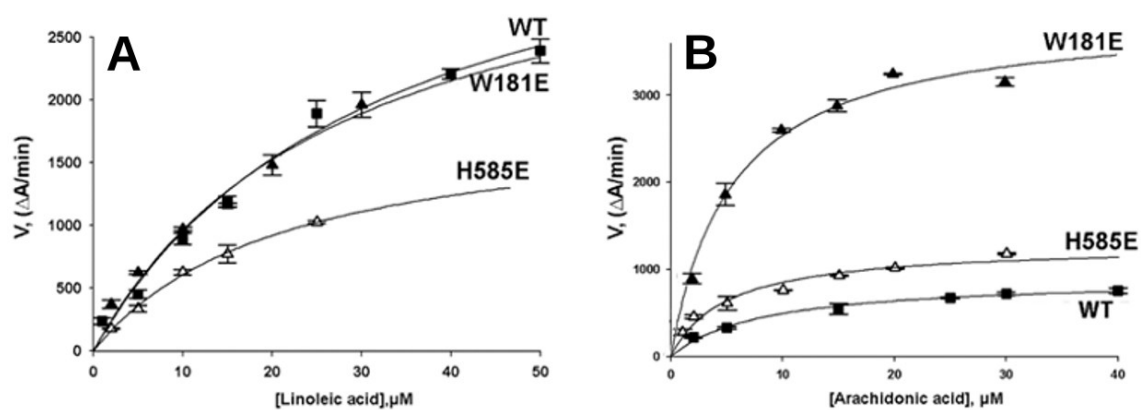


Figura 48. Cinéticas de reacción de la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y sus dos mutantes Trp181Glu (W181E) y His585Glu (H585E). La oxigenación del LA (panel A) y del AA (panel B) se determinó espectrofotométricamente (aumento de la absorbancia a 235 nm) a diferentes concentraciones de sustrato. Para cada medida se emplearon 56 nM de LOX (concentración final de la enzima) normalizado al contenido de hierro.

Es difícil interpretar la base estructural para las alteraciones observadas en la cinética de reacción, ya que tanto His585 como Trp181 no están en contacto directo con ninguno de los residuos que conforman el centro catalítico, de manera que estas mutaciones no deberían modificar directamente la estructura de dicho centro activo y, por lo tanto, no deberían alterar drásticamente la cinética de reacción de la oxigenación de ácidos grasos. Sin embargo, como se ha expuesto más arriba, se observa dicha alteración de la cinética de reacción de la oxigenación de ácidos grasos, cosa que sugiere que estas mutaciones afectan las propiedades catalíticas de la enzima de manera indirecta. Dado que tanto His585 como Trp181 se encuentran en la interfase del dímero, podría ser que mutaciones de estos residuos modificaran las interacciones intermonómero, cosa que se podría considerar como la base estructural para las alteraciones funcionales observadas. Por otra parte, His585 se encuentra en la hélice $\alpha 18$, la cual limita la profundidad de la cavidad

donde se une el sustrato^{28,38}, y por lo tanto debería ser importante para la unión del sustrato.

6.2.2.4 Simulación de MD para estudiar las alteraciones estructurales de la 15-LOX-1 de conejo inducidas por la mutación Trp181Glu

Para explorar la base estructural de las alteraciones funcionales observadas inducidas por las mutaciones de aminoácidos que se encuentran en la interfase del dímero se han realizado diversas simulaciones de MD. Se seleccionó el mutante Trp181Glu para nuestros experimentos *in silico*, ya que la correspondiente mutación es la que inducía unas alteraciones funcionales más pronunciadas (aumenta en 5 veces la eficiencia catalítica respecto del AA). Una vez el sistema se equilibró, se analizaron los cambios estructurales en la interfase del dímero mutante y se compararon con los de la enzima *wild-type*. El clúster hidrofóbico de leucinas con conformación *zipper* (Leu179(A), Leu183(A), Leu188(B) y Leu192(B)) de la interfase observado en la estructura cristalográfica para la enzima *wild-type* se preservó en gran medida en el mutante Trp181Glu a lo largo de todo el período de simulación (100 ns), pero es importante notar que la interfase está más abierta en la enzima mutante (paneles A y B de la Figura 49). De hecho, la distancia entre Leu179(A) y Leu192(B) aumentó significativamente y Leu183(A) y Leu188(B) se apartaron. La interacción entre Trp181(B) y His585(A) se interrumpió, aunque Glu181(B) y His585(A) se reorganizaron para formar un enlace de hidrogeno muy débil. En dicha enzima mutante, Glu181(A) y His585(B) se encontraban muy separados entre sí (17 Å por los 12 Å en el sistema *wild-type*). Otra alteración estructural interesante que indujo la mutación Trp181Glu fue la reorganización de las dos hélices $\alpha 2$ (panel B de la Figura 49). La hélice $\alpha 2$ del conformero A todavía muestra siete giros, pero está ligeramente doblada. Sin embargo, la hélice $\alpha 2$ del conformero B sufrió una distorsión muy drástica, manteniendo únicamente dos de sus cinco giros (panel B de la Figura 49). La pérdida del contenido de hélices α contribuye a la perturbación del clúster hidrofóbico entre las hélices $\alpha 2$ de los dos monómeros y a la pérdida de interacciones entre Glu181(B) y His585(A). En resumen, nuestras simulaciones de MD para el dímero mutante Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-*empty*(B) sugieren que dicho dímero Trp181Glu es estructuralmente menos estable, cosa que está de acuerdo con los resultados experimentales.

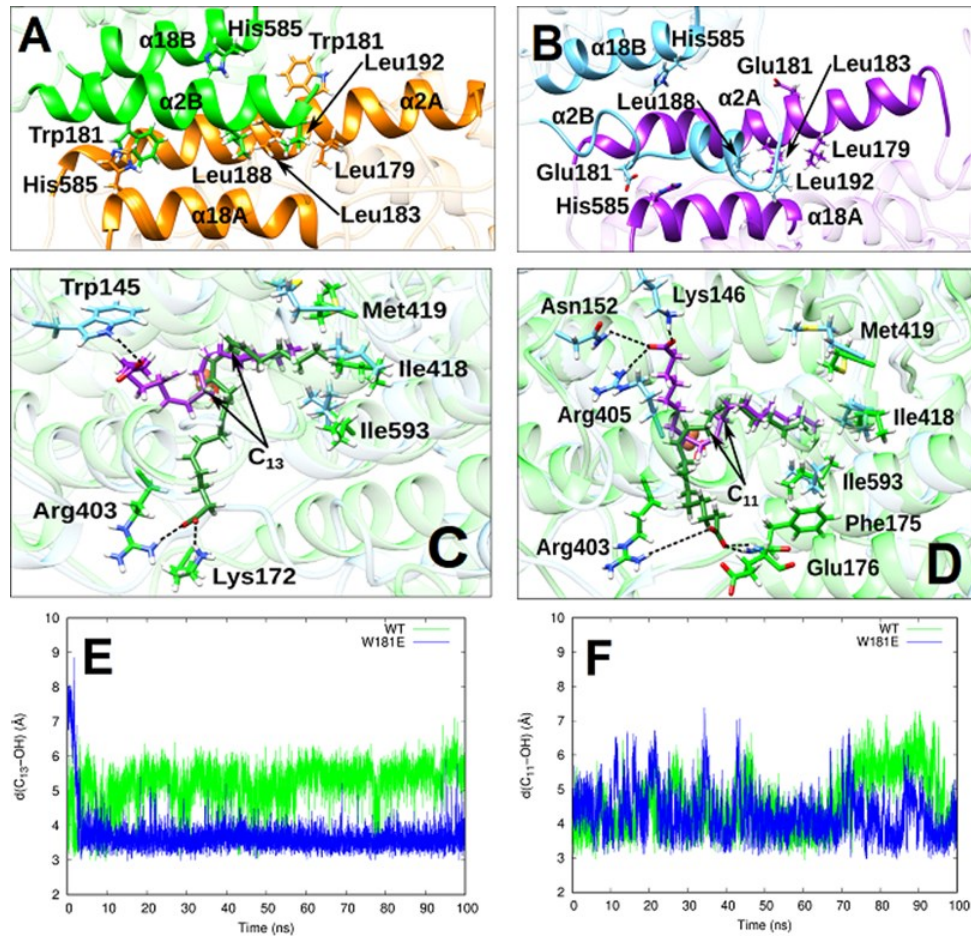


Figura 49. Consecuencias estructurales de la mutación Trp181Glu en la formación del dímero y en el alineamiento del sustrato. Interfase de la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* donde el confórmero A está representado en mostaza, mientras que el confórmero B está representado de verde (panel A). Interfase del mutante Trp181Glu de la 15-LOX-1 de conejo donde el confórmero A está representado en azul claro, mientras que el confórmero B está representado en lila (panel B). Modo de unión más representativo del AA en los dímeros 15-LOX-1 de conejo *wild-type* (verde oscuro) y Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) (lila) (panel C). Los esqueletos proteicos de 15-LOX-1 de conejo *wild-type* (verde con un cierto grado de transparencia) y de Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) (azul claro con un cierto grado de transparencia) se han superpuesto. Las cadenas laterales de algunos residuos seleccionados para los dímeros 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) se han representado en verde y azul claro, respectivamente. Modo de unión más representativo del LA en los dímeros 15-LOX-1 de conejo *wild-type* (verde oscuro) y Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-LA(B) (lila) (panel D). Los esqueletos proteicos de 15-LOX-1 de conejo *wild-type* (verde con un cierto grado de transparencia) y de Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-LA(B) (azul claro con un cierto grado de transparencia) se han superpuesto. Las cadenas laterales de algunos residuos seleccionados para los dímeros 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-LA(B) se han representado en verde y azul claro, respectivamente. Distancia C₁₃-OH en función del tiempo para los complejos 15-LOX-1 de conejo *wild-type*-AA (en verde) y Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) (en azul) (panel E). Distancia C₁₁-OH en función del tiempo para los complejos 15-LOX-1 de conejo *wild-type*-LA (en verde) y Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-LA(B) (en azul) (panel F).

6.2.2.5 Modos de unión del AA y LA

Para explorar el alineamiento del LA y del AA en el centro activo del conformero B del mutante Trp181Glu en primer lugar se han realizado estudios de *docking in silico*. A continuación, se seleccionó la pose de *docking* más estable para ambos sustratos y se calculó una trayectoria de MD de 100 ns para los complejos Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) y Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-LA(B). La conformación más representativa del AA y del LA unidos en la cavidad del monómero B para el mutante Trp181Glu-15-LOX-1 se obtuvieron a partir de análisis de clústeres. Dichos clústeres se clasificaron de acuerdo con una raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de 0.5 Å de los átomos pesados del AA y del LA, respectivamente. Además, se calculó el centroide del clúster más poblado de cada sustrato a lo largo de la simulación de MD donde el centroide corresponde a aquella estructura con la RMSD de los átomos pesados del sustrato más pequeña con respecto a la posición media de dichos átomos pesados sobre todas las estructuras del clúster. Las estructuras de dichos centroides para el AA y el LA en el mutante Trp181Glu-15-LOX-1 se representan en los paneles C y D de la Figura 49, respectivamente. Con el objetivo de poder comparar, también se han representado en dichos paneles de la Figura 49 las estructuras representativas de los centroides de los modos de unión del AA y del LA en la cavidad del monómero B para el dímero de 15-LOX-1 de conejo. Cabe destacar que las simulaciones de MD de los dos dímeros *wild-type* que tienen un sustrato unido (15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) y 15-LOX-1-*empty*(A)-LA(B)) se realizaron previamente³⁸. Los resultados para el sistema Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) mostraron que el AA está extendido dentro de la cavidad del mutante Trp181Glu, ocupando todo el espacio disponible. La cola hidrofóbica del AA está localizada cerca del fondo de la cavidad, rodeada por la triada de residuos Ile418, Met419 y Ile593²⁸. Durante la totalidad de la simulación de MD, el grupo carboxilato del AA estaba fijado por medio de un puente de hidrógeno con Trp145 ($d(\text{O}(\text{AA})-\text{H}-\text{Trp145}) = 2.4 \text{ \AA}$), tal y como aparece en el panel C de la Figura 49. El LA también se encuentra extendido con su cola próxima al fondo de la cavidad. De manera similar, el grupo carboxilato del LA estaba inmovilizado a lo largo de la simulación de MD mediante tres puentes de hidrógeno, tal y como se representa en el panel D de la Figura 49. Un enlace de hidrógeno se establecía con Arg405 ($d(\text{O}(\text{LA})-\text{H}(\text{Arg405})) = 2.2 \text{ \AA}$), otro con Asn152 ($d(\text{O}(\text{LA})-\text{H}(\text{Asn152})) = 3.3 \text{ \AA}$) y el último con Lys146 ($d(\text{O}(\text{LA})-\text{H}(\text{Lys146})) = 1.9 \text{ \AA}$). Estas simulaciones de MD no muestran un modo de unión en forma de U³²³ del AA en el dímero mutante Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B). En cambio, este modelo de unión en forma de U ha sido previamente confirmado en simulaciones de los complejos del AA con la 15-LOX de cerdo mutante que no contiene el dominio N-terminal²⁷³ y del AA con la 8*R*-LOX de coral³⁵⁷.

6.2.2.6 Análisis de las estructuras precatalíticas

En el panel E de la Figura 49 aparece la evolución de la distancia entre el C₁₃ del AA y el átomo de oxígeno del grupo OH⁻ del cofactor Fe(III)-OH⁻ a lo largo de la trayectoria de MD para el sistema Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B). Con el objetivo de poder

comparar, se incluye la correspondiente distancia de la simulación del complejo 15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) *wild-type*³⁸. El C₁₃ del AA cuando está unido en la cavidad del conformero B del sistema Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) se acerca al cofactor Fe(III)-OH⁻ de manera similar a como se observó para el dímero 15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) *wild-type* (panel E de la Figura 49), pero las fluctuaciones de la distancia C₁₃-OH durante la totalidad de la simulación de MD son menos pronunciadas para el mutante Trp181Glu. En la Tabla 7 se dan los promedios de las distancias C₁₃-OH, H_{13proS}-OH y H_{13proR}-OH para los complejos Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) y 15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) *wild-type*. El promedio de la distancia C₁₃-OH es 1.5 Å más corta en el mutante Trp181Glu que en la enzima *wild-type*. Como se ha mostrado en estudios previos^{271,274}, las estructuras precatalíticas para el mecanismo catalítico de las lipoxigenasas se definen de acuerdo con estos dos criterios: 1) $d(\text{H}_x\text{-OH}) \leq 3 \text{ \AA}$; 2) $d(\text{H}_x\text{-OH}) < d(\text{C}_x\text{-OH})$, donde X hace referencia a la posición donde se va a producir la abstracción de hidrógeno y el segundo criterio asegura que el correspondiente enlace C_x-H_x está orientado de manera adecuada para la abstracción de hidrógeno, el cual se ha usado para filtrar las estructuras bien orientadas para dicha abstracción. En el presente estudio, se ha observado un porcentaje muy alto de estructuras bien orientadas. En estudios previos, se ha mostrado que debido a las fluctuaciones estructurales del AA a lo largo de la trayectoria de MD en el complejo 15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) *wild-type*, la distancia promedio C₁₃-OH era bastante larga. En cambio, el AA permanece más rígidamente unido en la cavidad donde se une el sustrato en el complejo Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B), de manera que la distancia promedio C₁₃-OH es menor. Por consiguiente, el porcentaje de estructuras precatalíticas aumenta significativamente, en un factor de 16, en el caso de dicho mutante.

Tabla 7. Distancias promedio del C₁₃ ($d(\text{C}_{13}\text{-OH})$) y sus átomos de hidrógeno H_{13proS} ($d(\text{H}_{13\text{proS}}\text{-OH})$) y H_{13proR} ($d(\text{H}_{13\text{proR}}\text{-OH})$) del AA respecto del átomo de oxígeno del grupo OH⁻ del cofactor Fe(III)-OH⁻ para los complejos 15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B) de conejo *wild-type* y Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-AA(B).

Sistema	$d(\text{C}_{13}\text{-OH})$ (Å)	$d(\text{H}_{13\text{proS}}\text{-OH})$ (Å)	$d(\text{H}_{13\text{proR}}\text{-OH})$ (Å)	Estructuras con al menos un H bien orientado (%)	Estructuras precatalíticas (%)
Trp181Glu	3.70	4.50	3.15	99.10	55.69
<i>Wild-type</i>	5.19	4.85	5.47	97.78	3.40

En el panel F de la Figura 49 se muestra la evolución de la distancia entre el C₁₁ del LA y el átomo de oxígeno del grupo OH⁻ del cofactor Fe(III)-OH⁻ a lo largo de la trayectoria de MD para el sistema Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-LA(B). Con el objetivo de poder comparar, se incluye la correspondiente distancia de la simulación del complejo 15-LOX-1-*empty*(A)-LA(B) *wild-type*. Cuando el LA se encuentra unido en la cavidad del monómero B del sistema Trp181Glu-15-LOX-1-*empty*(A)-LA(B), su C₁₁ fluctúa alrededor de una distancia promedio respecto del átomo de oxígeno del grupo OH⁻ del cofactor Fe(III)-OH⁻ similar a la que se observaba en la simulación del complejo 15-LOX-1-

empty(A)-LA(B) *wild-type* (panel F de la Figura 49). Únicamente durante los últimos 25 ns, las fluctuaciones muestran diferencias significativas. La Tabla 8 resume las distancias promedio C₁₁-OH, H_{11proS}-OH y H_{11proR}-OH para el LA obtenidas para los complejos Trp181Glu-15-LOX-1-*empty(A)*-LA(B) y 15-LOX-1-*empty(A)*-LA(B) *wild-type*. La distancia promedio C₁₁-OH es sólo 0.3 Å más corta en el mutante Trp181Glu que en el sistema *wild-type*. Además, dicha distancia promedio es más grande que la correspondiente para el AA en el mismo sistema. El porcentaje de estructuras bien orientadas para el LA es un poco inferior en el complejo Trp181Glu-15-LOX-1-*empty(A)*-LA(B) que en el sistema *wild-type*. Con respecto a las estructuras precatalíticas, se ha obtenido un incremento de 1.6 veces en el caso del mutante, el cual es sustancialmente más pequeño que el obtenido para el AA.

Tabla 8. Distancias promedio del C₁₁ (d(C₁₁-OH)) y sus átomos de hidrógeno H_{11proS} (d(H_{11proS}-OH)) y H_{11proR} (d(H_{11proR}-OH)) del LA respecto del átomo de oxígeno del grupo OH⁻ del cofactor Fe(III)-OH⁻ para los complejos 15-LOX-1-*empty(A)*-LA(B) de conejo *wild-type* y Trp181Glu-15-LOX-1-*empty(A)*-LA(B).

Sistema	d(C ₁₁ -OH) (Å)	d(H _{11proS} -OH) (Å)	d(H _{11proR} -OH) (Å)	Estructuras con al menos un H bien orientado (%)	Estructuras precatalíticas (%)
Trp181Glu	4.26	4.17	4.18	87.99	22.65
<i>Wild-type</i>	4.58	4.74	4.56	90.09	14.40

Los resultados obtenidos a lo largo de las simulaciones de MD de los complejos Trp181Glu-15-LOX-1-*empty(A)*-AA(B) y 15-LOX-1-*empty(A)*-AA(B) *wild-type* sugieren que el AA está unido al centro activo de la enzima mutante de tal manera que se requeriría menos barrera de energía para catalizar la abstracción de hidrógeno del C₁₃ (ver Tabla 7). Estas simulaciones son congruentes con el incremento observado de 5 veces en la eficiencia catalítica para la oxigenación del AA en el sistema Trp181Glu (ver Tabla 6). Por otra parte, para los complejos que involucran el LA, se observan diferencias mucho más pequeñas cuando se compara 15-LOX-1 *wild-type* con su mutante Trp181Glu (ver Tabla 8). Este resultado está de acuerdo con nuestros datos experimentales (ver Tabla 6).

6.2.3 Conclusiones

Preparados puros de 15-LOX-1 de conejo y de 15-LOX-2 humana, que aparecían como una única banda en SDS-PAGE, muestran heterogeneidad estructural, dos bandas proteicas, cuando se analizan mediante PAGE en condiciones nativas, es decir, en estas condiciones nativas, estos dos conformeros diferentes se pueden separar entre sí en base a sus distintas movilidades electroforéticas. Estos datos sugieren que la 15-LOX en solución acuosa está presente como diferentes conformeros. Además, nuestros estudios de mutagénesis de aminoácidos que son importantes para la estabilidad de la interfase junto con cromatografía por exclusión de tamaño y con ensayos de movilidad electroforética

sugieren que esta heterogeneidad conformacional es una propiedad intrínseca del dominio catalítico. Por otra parte, dichos estudios de mutagénesis indican que estas mutaciones inducen alteraciones estructurales respecto del dímero *wild-type* que se propagan hasta el centro catalítico, modificando la actividad catalítica de la enzima. Más concretamente, se ha encontrado que la introducción de cargas negativas en las posiciones 181 o 585 (Trp181Glu y His585Glu) reducen la eficiencia catalítica de la oxigenación del LA. En cambio, este mismo parámetro se incrementa significativamente para la oxigenación del AA (ver Tabla 6 y Figura 48). Estos resultados nos indican que las mutaciones Trp181Glu y His585Glu convierten al AA en un mejor sustrato que el LA respecto de la oxigenación, situación totalmente opuesta a la que teníamos para la 15-LOX-1 de conejo *wild-type*. Nuestras simulaciones de MD confirman los resultados experimentales.

6.3 Papel de la Gln596 en la especificidad, estabilidad proteica y propiedades alostéricas de la 15-LOX de mamífero

6.3.1 Metodología

En relación con los cálculos de *docking*, éstos se realizaron con el programa GOLD5.2.2²⁴⁸ para el AA y el 19-HETE dentro de la cavidad del monómero B de la estructura cristalográfica dimérica de la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* (*PDB code* 2P0M)³⁷. Antes de iniciar el protocolo de *docking*, se eliminó el ligando unido en el centro activo de dicho monómero. Además, se generaron las coordenadas para los átomos de hidrógeno con el servidor web H++^{246,247} empleando un pH = 6.0 para los residuos titulables. En la exploración conformacional, el receptor se mantuvo fijo pero se otorgó flexibilidad completa al ligando. Se activó la opción de GOLD que tiene en cuenta las interacciones de ligandos orgánicos con iones metálicos en metaloenzimas, pero limitándolas a aquéllas en las que el átomo de hierro presenta una geometría hexacoordinada. Para garantizar una exploración extensiva del espacio conformacional de ambos sustratos se empleó el GA más eficiente. En los cálculos de *docking* se definió el lugar de unión del sustrato como una esfera de 20 Å de radio centrada en el átomo de hierro del monómero B del dímero de 15-LOX-1 de conejo *wild-type*. Se escogió la función *fitness* ChemScore para hacer una estimación de las energías de Gibbs de unión de los sustratos.

En relación con la mutagénesis *in silico*, el mutante Gln596Ala del monómero B del dímero de 15-LOX-1 se modeló usando el programa UCSF CHIMERA²⁷⁷.

Por último, en relación con las simulaciones de MD, el sistema se ha montado usando el procedimiento recomendado por el paquete de programas de AMBER²⁴⁹. Para los átomos de la proteína se utilizó el *force field* ff14SB²⁵⁰. Sin embargo, los parámetros de *force field* del AA se recuperaron de un trabajo previo de Tosco *et al.*³²⁵ mientras que los parámetros específicos para 19-HETE se desarrollaron en el presente trabajo. Los cálculos para generar los parámetros de dicho sustrato se llevaron a cabo siguiendo el protocolo estándar de AMBER con los módulos Antechamber y Parmchk2. Se usó la librería GAFF2^{249,251} como fuente para estos parámetros. Para optimizar la estructura de los sustratos se empleó el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) y las cargas atómicas de éstos se

asignaron por medio del procedimiento RESP²⁵² de Merz y Kollman. Además, el estado de protonación para ambos sustratos se estableció a mano para asegurar que éste coincidía con el estado de protonación en condiciones fisiológicas. En cuanto al átomo de hierro y su primera esfera de coordinación (His361, His366, His541, His545, Ile663 y el grupo OH⁻) se desarrollaron parámetros específicos MM en este trabajo por medio del procedimiento MCPB.py²⁵³ dentro del modelo enlazante y usando el método de Seminario²⁵⁴ para los cálculos de las constantes de fuerza.

Después de combinar los archivos de enzima y sustrato, se solvataron los diferentes complejos proteína-sustrato con una caja ortorrómbica de aguas TIP3P²⁵⁵ preequilibradas y su carga total se neutralizó añadiendo cationes de sodio mediante el programa tLeap. Los sistemas resultantes contienen aproximadamente 212000 átomos, de los cuales alrededor de 21000 pertenecen a la proteína. El resto de átomos corresponden a moléculas de agua y cationes sodio. Todas las simulaciones de MD se calcularon usando el mismo protocolo con la versión AMBER 16 GPU (CUDA) del paquete de programas PMEMD^{214,256}. En primer lugar, se sometió el sistema a 22000 pasos de minimización de energía usando el método *steepest descent* para evitar malos contactos. En los primeros 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos de proteína y sustrato con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻², de manera que únicamente se relajaron el solvente y los iones. En los siguientes 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos pesados del esqueleto proteico y del sustrato con, otra vez, una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻². Sin embargo, en los últimos 10000 pasos no se aplicó restricción alguna al sistema. Posteriormente, se realizaron las simulaciones de MD usando PBC. Los sistemas se calentaron gradualmente de 0 K a 300 K durante un período de 200 ps. A continuación, se calculó una simulación de MD de 1 ns a temperatura y presión constantes (300 K, 1 bar) para ajustar el volumen de la caja ortorrómbica de manera que la densidad resultante del sistema se encontrara alrededor de 1 g cm⁻³. Durante el calentamiento y la etapa isobárica, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos pesados del esqueleto proteico y del sustrato con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻², mientras que no se aplicaron restricciones al resto del sistema. La temperatura se controló por medio de dinámica de Langevin²¹⁶, mientras que la presión se ajustó mediante el baróstato de Berendsen²¹⁷. Después, se realizó una etapa de equilibración de 10 ns a temperatura (300 K) y volumen constantes. Finalmente, se calculó un período de producción de 100 ns dentro del mismo colectivo isotérmico-isocórico. Se usó un *time step* de 2 fs a lo largo de la totalidad de la trayectoria de MD. Todos los enlaces y ángulos que contenían átomos de hidrógeno se restringieron por medio del algoritmo SHAKE²¹⁵. Se calcularon las interacciones no enlazantes aplicando un *cutoff* de 9 Å. El análisis de las simulaciones de MD se realizó con AmberTools18, mientras que la visualización de éstas se llevó a cabo con los programas VMD²⁷⁶ y UCSF CHIMERA. Para el sistema del mutante Gln596Ala, la estructura apo del dímero primero se minimizó y equilibró (con un período de producción de MD de 20 ns). A continuación, para el mutante Gln596Ala con el AA unido al monómero B del dímero de 15-LOX-1 de conejo se repitió el mismo protocolo de MD empleado para los sistemas *wild-type*.

6.3.2 Resultados

6.3.2.1 Mutaciones en Gln596 afectan los parámetros cinéticos y la especificidad de productos de la oxigenación del AA catalizada por la 15-LOX (Resultados experimentales)

La comparación de múltiples secuencias de aminoácidos de 15-LOXs de mamíferos superiores indica que el residuo Gln596 forma parte de una región conservada de la enzima que involucra la hélice α 18 (aminoácidos 584-597). En general, la Gln596 (nomenclatura de la 15-LOX-1 de conejo) se preserva en gran medida en los mamíferos superiores (Figura 50), aunque las 15-LOXs de roedores presentan otros aminoácidos en esta posición (Leu en la posición 596 en ratones, His en la posición 596 en ratas canguro, conejillos de indias, chinchillas y ratas topo). Se desconoce la relevancia biológica de estas variaciones de secuencia en los roedores y sería muy interesante explorarla en estudios posteriores.

Human (<i>H. sapiens</i>)	581 pnfhqaslqmsitwqlgrr ⁵⁹⁹	NP_001131.3
Chimpanzee (<i>Pan paniscus</i>)	581 pnfhqaslqmsitwqlgrr ⁵⁹⁹	XP_016786758.1
Gorila (<i>Gorila Gorila</i>)	581 pnfhqaslqmsitwqlgrr ⁵⁹⁹	XP_018868474.1
Orangutan (<i>Pongo abeli</i>)	581 pnfhqaslqmsitwqlgrr ⁵⁹⁹	NP_001127349.1
Rabbit (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	582 l pnlqsslqmsivwqlgrd ⁶⁰⁰	XP_015292963.1
Rhesus monkey (<i>Macaca mulata</i>)	581 pnfhqaslqmsitwqlgrr ⁵⁹⁹	XP_009187662.1
Baboon (<i>Papio anubis</i>)	581 pnfhqaslqmsmtwqlgrr ⁵⁹⁹	NP_001075751.1
Squirrel monkey (<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>)	582 pnlhqsslqmsivwqlgrd ⁶⁰⁰	XP_003929174.1
Dog (<i>Canis lupus familiaris</i>)	582 pnchqaslqmsitwqlgrr ⁶⁰⁰	XP_546576.2
Pig (<i>Sus scrofa</i>)	582 pnfhqaslqmsitwqlgrc ⁶⁰⁰	XP_003483140.1
Bison (<i>Bison bison bison</i>)	582 pnlhqsslqmsivwqlgrd ⁶⁰⁰	XP_010845670.1
White rhinoceros (<i>Ceratotherium simum simum</i>)	582 pnlhqsslqmsivwqlgrd ⁶⁰⁰	XP_004433240.1
California sea lion (<i>Zalophus californianus</i>)	582 pnfhqaslqmsivwqlgrr ⁶⁰⁰	XP_027424385.1
Walrus (<i>Odobenus rosmarus divergens</i>)	582 pnlhqsslqmsivwqlgrd ⁶⁰⁰	XP_004398616.1
Grizzly bear (<i>Ursus arctos horrobilis</i>)	582 pnfhqaslqmsivwqlgrr ⁶⁰⁰	XP_026376572.1
European hedgehog (<i>Erinaceus europaeus</i>)	583 pnfhqaslqmsitwqlgrr ⁶⁰¹	XP_007521680.1
Large flying fox (<i>Pteropus vampyrus</i>)	582 pnlhqsslqmsivwqlgrd ⁶⁰⁰	XP_011357989.1
Mouse (<i>Mus muscus</i>)	582 pnpnqstlqinvvwllgrr ⁶⁰⁰	NP_033790.3
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	582 pnpnqstlqinvvwllgrr ⁶⁰⁰	NP_112272.2

Figura 50. Comparación de múltiples secuencias de aminoácidos de 15-LOXs de mamíferos superiores. En la columna derecha se dan los números de acceso de las secuencias en la base de datos Pubmed.

Para comprobar si Gln596 puede ser importante para la unión del sustrato y la especificidad de productos, primero se ha mutado este aminoácido a los residuos hidrofóbicos Ala y Leu, los cuales difieren entre sí por los volúmenes de Van der Waals de sus cadenas laterales. Se expresaron y purificaron la 15-LOX-1 de conejo *wild-type*, la 15-LOX-1 humana *wild-type* y sus correspondientes mutantes que sólo contenían una mutación en dicha posición. Posteriormente, se determinó la eficiencia catalítica (cociente k_{cat}/K_M) para estas enzimas usando el AA como sustrato. Como se puede apreciar en la Tabla 9, la eficiencia catalítica de la 15-LOX-1 de conejo ($1.63 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) era 2.5 veces superior a la de su ortóloga humana ($0.60 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$).

Tabla 9. Parámetros cinéticos de las 15-LOXs *wild-type* y mutantes de conejo y humano. Se incubaron durante 3 min en un buffer 50 mM de fosfato la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y sus mutantes (2.5 μg de proteína de 15-LOX pura) y la 15-LOX-1 humana *wild-type* y sus mutantes (15 μg de proteína de 15-LOX pura) con diferentes concentraciones de AA (volumen de reacción de 1 ml). Las actividades catalíticas de los diferentes preparados de enzima se normalizaron a su contenido de hierro. La reacción se comenzó por medio de la adición de la enzima. Se calcularon las constantes cinéticas (K_M , k_{cat}) y se determinaron los cocientes k_{cat}/K_M como medida de la eficiencia catalítica. Todos los datos corresponden al valor medio \pm error estándar de la media (SEM) de tres medidas independientes ($n = 3$).

Enzima	Mutante	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
15-LOX de conejo	<i>Wild-type</i> -Q596	13.2 ± 3.2	21.6 ± 2.3	1.63
	Q596A	28.6 ± 3.4	18.9 ± 0.9	0.66
	Q596L	n.d. ^a	< 2	n.d.
	Q596P	n.d. ^b	n.d. ^b	n.d.
	Q596E	14.0 ± 2.9	7.3 ± 1.1	0.52
15-LOX humana	<i>Wild-type</i> -Q596	4.4 ± 0.8	2.65 ± 0.14	0.60
	Q596A	9.6 ± 1.4	0.78 ± 0.03	0.08
	Q596L	9.7 ± 1.6	1.0 ± 0.1	0.11
	Q596P	12.8 ± 1.9	3.9 ± 0.3	0.30
	Q596E	4.9 ± 1.3	1.5 ± 0.2	0.30

n.d. indica no determinado.

^aInhibición pronunciada del sustrato.

^bInactivación de la proteína durante su purificación, la actividad de la fracción mutante no purificada constituía un 30% de la actividad correspondiente de la enzima *wild-type*.

Por otra parte, la introducción de un pequeño residuo hidrofóbico como es la Ala en la posición 596 reduce la eficiencia catalítica tanto de la 15-LOX-1 de conejo como de su ortóloga humana (ver Tabla 9). Se observó un efecto similar cuando se introdujo un residuo más voluminoso como es la Leu en esta posición (ver Tabla 9). Para el mutante Gln596Leu de la enzima de conejo también se observó una gran inhibición a concentraciones del ácido graso superiores a 10 μM (ver paneles A y B de la Figura 51). Previamente, se había observado una inhibición similar cuando la Arg403 se mutó a Leu en la 15-LOX-1 de conejo³⁵⁶. Debido a que Gln596 forma parte de la hélice $\alpha 18$, a continuación, se exploró si la introducción de un residuo que favorece la ruptura de las hélices α como es el residuo Pro puede tener consecuencias en la eficiencia catalítica. En este caso, se determinó que la eficiencia catalítica de la 15-LOX-1 humana se redujo alrededor del 50% cuando Gln596 se mutó a Pro (k_{cat}/K_M de $0.30 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ para el mutante Gln596Pro frente a $0.60 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ para la enzima *wild-type*, ver Tabla 9). Por desgracia, cuando se purificó el mutante Gln596Pro para la 15-LOX-1 de conejo se produjo una gran disminución en la actividad catalítica, de manera que no se pudo cuantificar el cociente k_{cat}/K_M para este mutante. Sin embargo, la actividad catalítica del preparado bruto de dicho mutante equivalía al 35-40% de la actividad de la enzima *wild-type* cuando

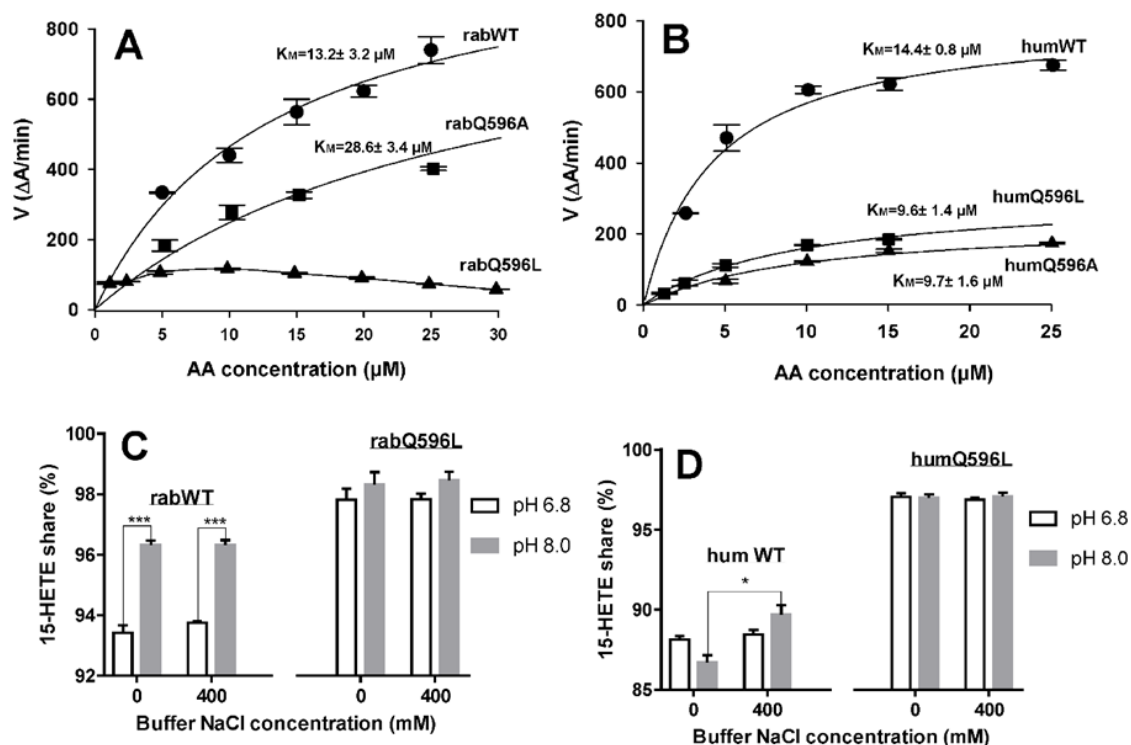


Figura 51. Cinética de reacción y especificidad de productos de los mutantes de 15-LOX. Efecto de mutaciones puntuales en las propiedades catalíticas de la oxigenación del AA catalizada por 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y sus mutantes (panel A) y 15-LOX-1 humana *wild-type* y sus mutantes (panel B). Se incubaron en PBS la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y sus mutantes (2.5 μg) o la 15-LOX-1 humana *wild-type* y sus mutantes (15 μg) con diferentes concentraciones de AA. Las actividades catalíticas de los diferentes preparados de enzima se normalizaron al contenido de hierro. La reacción se inició por medio de la adición del sustrato. Todos los datos están representados como media ± SEM de tres medidas independientes (n = 3). Efecto de pH y sal en la especificidad de producto de la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* (panel C), de la 15-LOX-1 humana *wild-type* (panel D) y de sus mutantes Gln596Leu (Q596L). Se incubaron en un buffer de fosfato de 50 mM alícuotas de 15-LOX *wild-type* o de su mutante Gln596Leu (2.5 μg para enzimas de conejo y 15 μg para enzimas humanas) con AA (concentración final de 50 μM) durante 3 min a dos valores diferentes de pH conteniendo concentraciones variables de NaCl. Todos los datos están representados como media ± SEM de tres medidas independientes (n = 3).

se normalizaron los dos preparados enzimáticos a un contenido similar de 15-LOX en el sobrenadante del lisado bacteriano (*immunoblotting*). Estos resultados indican que la mutación Gln596Pro en la 15-LOX-1 de conejo induce inestabilidad estructural, la cual resulta en una pérdida completa de la actividad enzimática durante la purificación de la proteína. Dado que Gln596 se encuentra en el extremo final de la hélice α18 del dominio catalítico, la explicación más plausible para este resultado es que la mutación Gln596Pro desestabiliza la estructura hélice-giro de esta región. Tras todo lo expuesto, se puede concluir que la mutación Gln596Pro atenúa la actividad catalítica de la oxigenación del AA tanto para la 15-LOX-1 de conejo como para su ortóloga humana. En último lugar, se exploró si la introducción de una carga negativa, como la que posee Glu, en la posición

596 también afecta a la eficiencia catalítica. En este caso se pudo determinar el cociente k_{cat}/K_M para la 15-LOX-1 de conejo ($0.52 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) y su ortóloga humana ($0.30 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$). Estos cocientes eran significativamente más pequeños que los correspondientes de las enzimas *wild-type*.

Tabla 10. Velocidades de conversión relativas de los diferentes sustratos para la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y su mutante Gln596Ala. Se incubaron en tampón fosfato salino (PBS) la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* (10-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y su mutante Gln596Ala (10-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) con los diferentes sustratos (30 μM de concentración de sustrato). Después de un período de incubación de 5 min, se cuantificó el sustrato restante por medio de *reversed-phase high-performance liquid chromatography* (RP-HPLC) y se calculó y normalizó la velocidad de conversión de sustrato al contenido de proteína. Se realizó como control negativo una incubación no enzimática (a la mezcla de incubación se añadió buffer en lugar de solución enzimática). La velocidad de conversión del AA por medio de la 15-LOX-1 humana *wild-type* se definió como 100%.

Sustrato	Velocidad de conversión relativa (%)	
	<i>Wild-type</i>	Gln596Ala
AA	100.0 ± 2.3	96.3 ± 0.5
19-HETE	9.7 ± 0.1	48.6 ± 0.3
15-HETE	3.4 ± 0.1	2.1 ± 0.2

Tabla 11. Especificidad de productos de las variantes de 15-LOX de conejo y humana. Se realizaron ensayos de actividad *in vitro* con las diferentes variantes enzimáticas. Después del período de incubación (5 min), se terminó la reacción por medio de la adición de borohidruro de sodio y los productos de reacción se analizaron mediante RP-HPLC. Todos los datos están representados como media \pm SEM de tres medidas independientes ($n = 3$).

Enzima	Mutante	Productos de reacción	
		15-HETE	12-HETE
15-LOX de conejo	<i>Wild-Type</i> -Q596	95.30 ± 0.19	4.70 ± 0.19
	Q596A	98.92 ± 0.09	1.08 ± 0.09
	Q596L	98.44 ± 0.07	1.56 ± 0.07
	Q596F	98.50 ± 0.05	1.50 ± 0.05
	Q596P	94.40 ± 0.12	5.60 ± 0.12
	Q596E	93.54 ± 0.08	6.46 ± 0.08
15-LOX humana	<i>Wild-Type</i> -Q596	90.23 ± 0.63	9.77 ± 0.63
	Q596A	95.51 ± 0.71	4.49 ± 0.71
	Q596L	97.72 ± 0.46	2.28 ± 0.46
	Q596F	98.06 ± 0.06	1.94 ± 0.06
	Q596P	75.36 ± 1.04	24.60 ± 1.04
	Q596E	74.46 ± 2.71	25.54 ± 2.71

Por otra parte, para explorar el impacto de la mutación de Gln596 en la especificidad del sustrato se realizaron experimentos comparativos con la 15-LOX-1 humana *wild-type* y su mutante Gln596Ala empleando AA, 15(*S*)-HETE y 19(*R/S*)-HETE como sustratos. Es bien conocido que 19(*R/S*)-HETE es un mal sustrato de la 15-LOX que se caracteriza por una velocidad catalítica baja y un valor de K_M relativamente alto siendo oxigenado casi exclusivamente a 15(*S*),19(*R/S*)-diHETE. Se repitió la caracterización cinética para la oxigenación de 19-HETE catalizada por la enzima recombinante de 15-LOX-1 humana y se calcularon las constantes cinéticas ($k_{cat} = 0.39 \pm 0.16 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 134.5 \pm 10.9 \text{ }\mu\text{M}$). Estos datos son congruentes con los resultados obtenidos para la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* nativa³⁵⁸. Para calcular las velocidades de reacción relativas, se cuantificó el grado de consumo de sustrato para cada combinación enzima-sustrato y se fijó la k_{cat} del AA por la enzima *wild-type* como 100%. En la Tabla 10 se puede apreciar que el AA resulta el mejor sustrato tanto para la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* como para su mutante Gln596Ala. Para la enzima *wild-type*, 19-HETE (10%) y 15-HETE (3%) se convierten de una manera mucho menos efectiva. Se observó un comportamiento similar para el mutante Gln596Ala (Tabla 10). Sin embargo, para este mutante el 19-HETE resulta ser un sustrato adecuado, ya que su velocidad de conversión es aproximadamente un 50% de la del AA.

A continuación, se comparó la especificidad de producto de la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y su ortóloga humana *wild-type* con la especificidad de las enzimas mutantes. En general, las 15-LOXs de mamíferos ortólogas muestran especificidades posicionales duales, ya que éstas oxigenan al AA a tanto 15-HpETE como 12-HpETE^{359,360}. Cuando se repitieron los experimentos se obtuvieron las siguientes proporciones 15-HpETE/12-HpETE: 95.3 ± 0.2 frente a 4.7 ± 0.2 para la 15-LOX-1 de conejo recombinante, 91.9 ± 0.7 frente a 8.1 ± 0.7 para la 15-LOX-1 de conejo nativa y 90.2 ± 0.6 frente a 9.8 ± 0.8 para la 15-LOX-1 humana recombinante. Estos datos son congruentes con los resultados previamente publicados^{328,360,361}. Se observó una disminución pequeña pero significativa estadísticamente (test-t apareado) en la proporción relativa del producto de oxigenación menor (12-HpETE) cuando se comparan las ortólogas de 15-LOX *wild-type* con los correspondientes mutantes Gln596Ala y Gln596Leu (ver Tabla 11). También se obtuvieron datos similares para el mutante Gln596Phe (ver Tabla 11). En cambio, para el mutante Gln596Pro de la 15-LOX-1 humana se ha observado un incremento de casi 2.5 veces en la formación de 12-HpETE (ver Tabla 11). Por otra parte, el efecto de esta mutación en la 15-LOX-1 de conejo (ver Tabla 11) fue menos pronunciado, pero todavía significativo desde un punto de vista estadístico. Cuando Gln596 se mutó a Glu, un residuo cargado negativamente, la especificidad de sustrato tanto de la 15-LOX-1 de conejo como de su ortóloga humana era muy similar a la observada para el mutante Gln596Pro (ver Tabla 11). Es importante notar que nuestros datos indican que una mutación específica en ortólogos diferentes de 15-LOX puede tener consecuencias funcionales variables, de manera que es arriesgado predecir las consecuencias funcionales de una mutación específica realizada en otro ortólogo de 15-LOX de mamífero en base a los resultados obtenidos para la enzima humana. Por otra parte, todos estos datos expuestos en relación con los efectos de la mutación en la posición 596 en los parámetros cinéticos y en la especificidad de productos de la oxigenación del AA catalizada por la 15-LOX sugieren que dicho residuo puede ser relevante desde un punto de vista de la

catálisis. Por último, para determinar la composición enantiomérica de los productos principales de reacción, se volvieron a analizar los isómeros HETE mediante *chiral-phase high-performance liquid chromatography* (CP-HPLC). Como era de esperar, para todas las variantes de 15-LOX analizadas se encontró que tanto el producto principal de oxigenación (15-HpETE) como el minoritario (12-HpETE) estaban presentes como (*S*)-enantiómeros.

6.3.2.2 Efecto de pH y sal en la especificidad de productos de la 15-LOX-1 de conejo *wild-type*, sus mutantes y los correspondientes ortólogos humanos (Resultados experimentales)

Gln596 no limita de manera directa la cavidad donde se une el sustrato, pero sus interacciones hidrofóbicas o electrostáticas pueden interconectar este aminoácido con los residuos que conforman el centro catalítico. En tal caso, sería de esperar que cambios en el pH y alteraciones de la fuerza iónica del buffer de reacción indujeran reorganizaciones de dichas interacciones, las cuales se verían reflejadas en modificaciones de las propiedades catalíticas. Cuando se incubó la 15-LOX-1 de conejo en un buffer de fosfato a dos valores diferentes de pH (6.8 y 8.0), se observó un aumento sutil pero significativo desde un punto de vista estadístico en la formación del producto de oxigenación mayoritario (15-HETE) a valores de pH mayores. Este efecto se observó en presencia y ausencia de sal (columnas de la izquierda del panel C de la Figura 51). En cambio, alteraciones de la fuerza iónica del buffer no indujeron cambios significativos. Para la 15-LOX-1 humana no se observaron cambios en la especificidad de reacción a diferentes valores de pH, pero la formación de 15-HETE aumentó a fuerzas iónicas mayores con un pH de 8 (columnas de la izquierda del panel D de la Figura 51). A pH de 6.8 no se observó este efecto. Aunque estas alteraciones de especificidad observadas eran bastante sutiles, eran muy significativas desde un punto de vista estadístico. A diferencia de las enzimas *wild-type*, ni el pH ni la sal afectaron el patrón de productos cuando se usaron los mutantes Gln596Leu de conejo y humano (columnas de la derecha de los paneles C y D de la Figura 51). También se obtuvieron datos similares para el mutante Gln596Ala de conejo (datos no mostrados). Todos estos datos sugieren que las mutaciones en Gln596 tienen un impacto sobre las propiedades funcionales de la enzima, de manera que debe existir una conexión entre este aminoácido y los residuos del centro activo.

6.3.2.3 Efecto de la mutación Gln596Ala en la formación de los productos secundarios de oxigenación (Resultados experimentales)

En bien conocido que los ortólogos de 15-LOX transforman su producto primario de oxigenación del AA (15-HpETE) a una mezcla de 5,15-diHpETE, 8,15-diHpETE y productos de hidrólisis de 14,15-LTA₄⁴⁶. Para probar si la mutación Gln596Ala altera el patrón de productos de oxigenación secundarios, se han analizado estos productos formados por la enzima *wild-type* y dicho mutante. Para llevar a cabo esto, se ha incubado

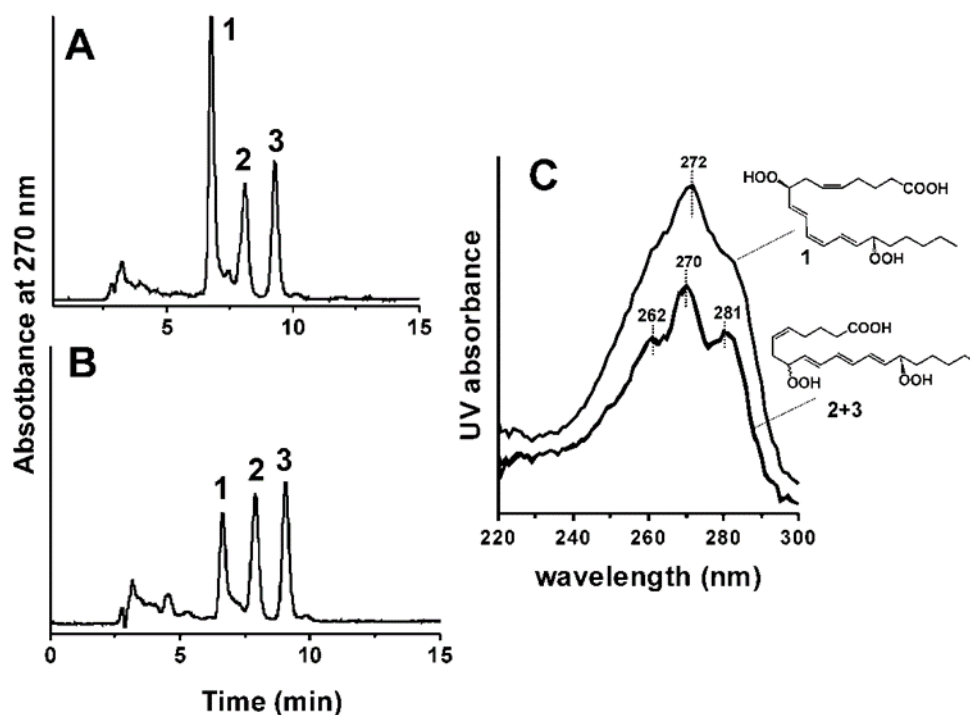


Figura 52. Análisis por medio de *normal-phase high-performance liquid chromatography* (NP-HPLC) de los productos de reacción formados por la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* recombinante (gráfico B) y su mutante Gln596Ala (gráfico A) durante la incubación de 15(*S*)-HpETE como sustrato. Se incubaron en PBS las variantes de 15-LOX con 15(*S*)-HpETE (concentración final de 50 μ M) durante 15 min. Los productos de oxigenación se aislaron por medio de RP-HPLC y se analizaron posteriormente mediante NP-HPLC. El producto 1 se identificó como (*Z,E,Z,E*)-8(*S*),15(*S*)-diHETE mediante cocromatografía con un estándar auténtico y por medio de sus propiedades espectrales UV ($\lambda_{\text{max}} = 272$ nm, ver gráfico C). La estructura de este producto sugiere que proviene de la doble oxigenación. Los productos 2 y 3 representan diastereoisómeros de 8(*R/S*),15(*S*)-diHETE. Producto 2: (*Z,E,E,E*)-8(*R*),15(*S*)-diHETE, producto 3: (*Z,E,E,E*)-8(*S*),15(*S*)-diHETE. Los espectros UV de estos dos productos eran idénticos, pero la $\lambda_{\text{max}} = 270$ nm estaba desplazada hacia el azul cuando se comparaba con el producto 1. Estos datos espectrales UV eran congruentes con la estructura de *E,Z,E*-trieno del producto 1 y con la estructura *E,E,E*-trieno de los productos 2 y 3. Lo más probable es que los productos 2 y 3 se originaran vía hidrólisis no enzimática del intermedio 14,15-LTA₄, el cual se formó a partir de 15(*S*)-HpETE mediante la actividad leucotrieno sintasa de las variantes de 15-LOX.

tanto la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* como su mutante Gln596Ala con 15(*S*)-HpETE y se han analizado los productos de reacción por medio de RP-HPLC. Se observó que con ambas enzimas se formaron bastantes trienos conjugados. Mediante análisis adicionales, se caracterizaron estos compuestos y se obtuvo más información de su estructura química. Para la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* se formaron tres trienos conjugados diferentes en cantidades similares (Figura 52). La identidad de estos tres trienos era (*Z,E,Z,E*)-8(*S*),15(*S*)-diHETE, (*Z,E,E,E*)-8(*R*),15(*S*)-diHETE y (*Z,E,E,E*)-8(*S*),15(*S*)-diHETE, donde el primero de los trienos enumerados debe ser el que proviene del producto de

doble oxigenación basándonos en su estructura química, mientras que los otros dos trienos deben provenir de los productos de hidrólisis no enzimática de 14,15-LTA₄, ya que están presentes en cantidades similares⁴⁶. Para el mutante Gln596Ala, se identificaron los mismos productos, pero el (*Z,E,Z,E*)-8(*S*),15(*S*)-diHETE era el dominante. Estos datos sugieren que la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* prefiere la formación de 14,15-LTA₄ (actividad leucotrieno sintasa) respecto la oxigenación de 15(*S*)-HpETE (actividad de doble oxigenación). En cambio, para el mutante Gln596Ala la actividad de doble oxigenación es dominante.

6.3.2.4 Efecto de la mutación de Gln596 en las propiedades alostéricas de la 15-LOX (Resultados experimentales)

Es bien conocido que las isoformas de las LOXs necesitan la presencia de ácidos grasos hidroperóxidos endógenos, tales como 13(*S*)-HpODE o 15(*S*)-HpETE, para alcanzar su máxima actividad catalítica. Esta activación enzimática dependiente de un grupo peróxido normalmente se explica por medio de la oxigenación inducida por el grupo peróxido de la forma ferrosa Fe²⁺-LOX catalíticamente inactiva a una forma férrica Fe³⁺-LOX que es catalíticamente activa. Sin embargo, la activación enzimática inducida por un grupo peróxido es aparentemente más compleja que una simple oxidación de un átomo de hierro, ya que los peróxidos de los ácidos grasos también se han identificado como reguladores alostéricos^{337,338}. De manera similar a 13(*S*)-HpODE, el 13(*S*)-HODE también actúa como regulador alostérico, el cual favorece la dimerización de la 15-LOX-1 de conejo nativa³⁴, pero no puede oxidar el átomo de hierro unido a la enzima que no forma parte de un grupo hemo, tal y como sí puede hacer el 13(*S*)-HpODE. Cuando se repitieron los experimentos con la 15-LOX-1 de conejo recombinante purificada se observó un aumento significativo en la actividad catalítica tanto con 5 μM de 13(*S*)-HODE (144 ± 12%) como con 5 μM de 13(*S*)-HpODE (178 ± 14%) actuando como activadores (paneles A y B de la Figura 53). Un mayor aumento en las concentraciones de efector no alteró más la actividad catalítica. Curiosamente, la activación enzimática era menos pronunciada a concentraciones de sustrato superiores. Dado que 13(*S*)-HODE no puede cambiar el estado de oxidación del átomo de hierro, se puede suponer que el efecto activante de 13(*S*)-HODE puede estar relacionado con una activación alostérica además de con una oxidación de la enzima.

Para cerciorarse de esta hipótesis, se seleccionó otro sustrato de 15-LOX, 19(*R/S*)-HETE, para el cual se ha observado previamente una inactivación reversible de la 15-LOX asociada con la formación de la enzima ferrosa catalíticamente inactiva. Cuando se compararon los efectos tanto de 13(*S*)-HpODE como de 13(*S*)-HODE en la oxigenación de 19(*R/S*)-HETE, se observó que estos ligandos inducían un aumento significativo en la velocidad de oxigenación de 19(*R/S*)-HETE catalizada por la 15-LOX-1 de conejo recombinante. Es necesario subrayar que a diferencia del AA (paneles A y B de la Figura 53), la activación máxima se alcanzó a 10 μM de 13(*S*)-HpODE y a concentraciones de sustrato superiores (200 μM). De hecho, empleando dicha concentración de efector se determinó que el efecto activador de 13(*S*)-HODE (287 ± 11%) sólo constituía una tercera parte del de 13(*S*)-HpODE (823 ± 30%) (paneles C y D de la Figura 53). Es importante

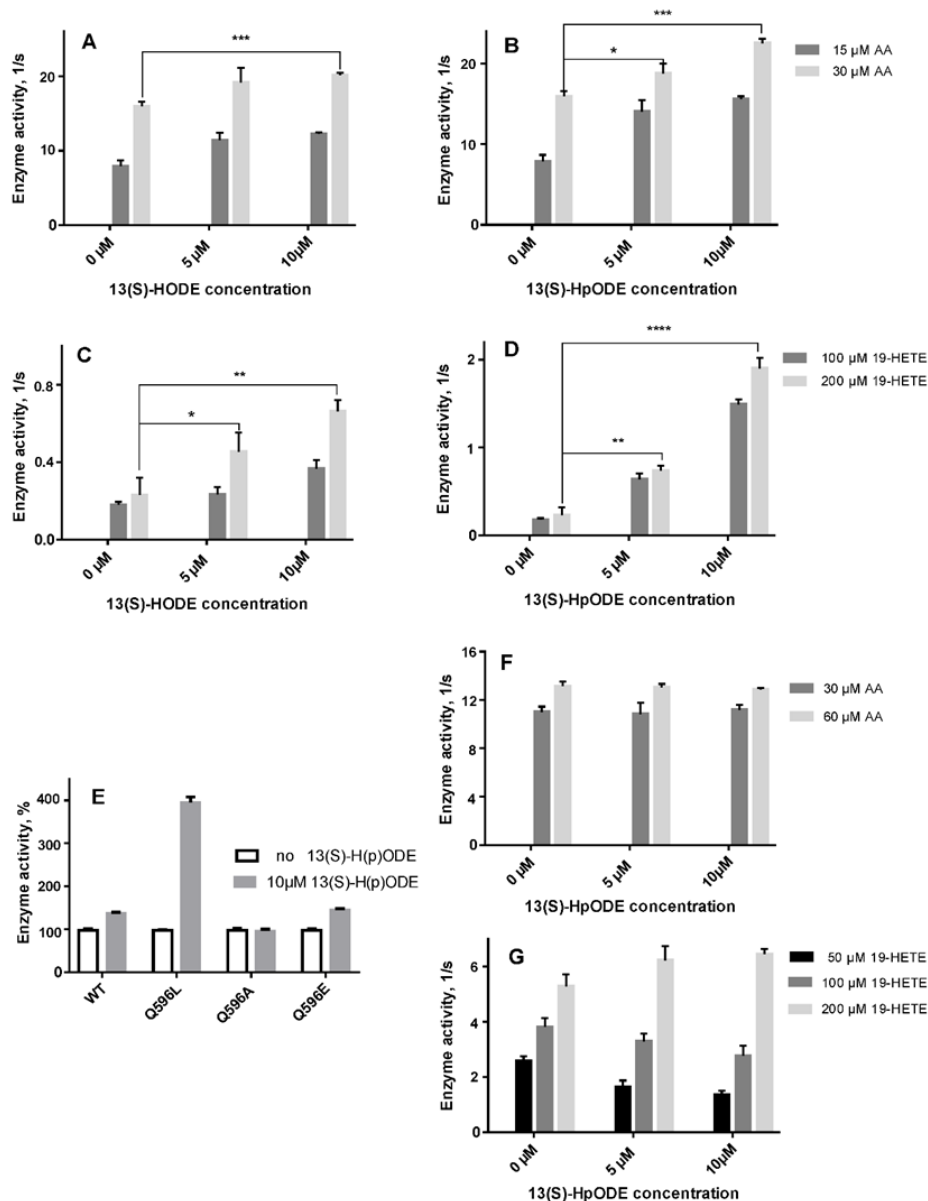


Figura 53. Impacto de los activadores en la oxigenación de los ácidos grasos catalizada por la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y sus mutantes. La 15-LOX-1 de conejo *wild-type* recombinante se preincubó con etanol o con 5 μM o 10 μM de 13(*S*)-HpODE durante 30 s y después se inició la reacción por medio de la adición de AA (paneles A y B; 15 o 30 μM) o 19-HETE (paneles C y D; 100 o 200 μM) considerando los diferentes valores de K_M para los dos sustratos³⁵⁸. Efecto de 13(*S*)-HpODE en la velocidad de oxigenación del AA (60 μM) catalizada por la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y sus mutantes (panel E). Efecto de 13(*S*)-HpODE en la velocidad de oxigenación del AA (30 o 60 μM) y del 19-HETE (50, 100 o 200 μM) catalizada por el mutante Gln596Ala de conejo (paneles F y G, respectivamente). Se preincubó el mutante Gln596Ala recombinante (83 nM) con etanol o con 13(*S*)-HpODE durante 30 s a las concentraciones indicadas y se inició la reacción mediante la adición de diferentes concentraciones de sustrato. La actividad de las enzimas se normalizó al contenido de hierro. Todos los datos están representados como media \pm SEM de tres medidas independientes ($n = 3$). 13(*S*)-HpODE no exhibió ningún efecto activador en la actividad catalítica del mutante Gln596Ala.

notar que la activación de 13(*S*)-HODE era dos veces superior para 19(*R/S*)-HETE que para AA. Estos datos son congruentes con nuestra propuesta de que la oxidación inducida por un grupo peróxido de la forma ferrosa de 15-LOX no es el único mecanismo de activación. De hecho, la activación alostérica inducida por un ligando también puede contribuir.

De entre las variantes enzimáticas probadas, se observó que el mutante Gln596Leu de la 15-LOX-1 de conejo era el que presentaba el efecto alostérico más pronunciado. Para la enzima *wild-type* y su mutante Gln596Glu, el efecto activador de 13(*S*)-HpODE era mucho menor (panel E de la Figura 53). Sorprendentemente, la mutación Gln596Ala eliminaba totalmente la sensibilidad de la enzima respecto de la activación por medio de 13(*S*)-HODE (datos no mostrados) y 13(*S*)-HpODE (paneles F y G de la Figura 53). De manera interesante, la k_{cat} para esta enzima mutante respecto la oxigenación de 19(*R/S*)-HETE era un orden de magnitud superior respecto de la enzima *wild-type*. De hecho, para esta enzima mutante la velocidad de oxigenación de 19(*R/S*)-HETE ($8.2 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$) era comparable a la del AA. A concentraciones bajas de 19(*R/S*)-HETE (50 y 100 μM) incluso se observó una ligera inhibición de la actividad catalítica por parte de 13(*S*)-HpODE.

6.3.2.5 Dependencia con la temperatura de las estructuras secundaria y terciaria de la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y sus mutantes Gln596Ala/Leu (Resultados experimentales)

Debido a que los mutantes Gln596Ala y Gln596Leu muestran diferentes comportamientos de activación respecto 13(*S*)-HpODE, se ha explorado el efecto de estas mutaciones en la estructura proteica global. Se ha monitorizado la estructura secundaria de la 15-LOX-1 de conejo mediante espectroscopia CD. La mutación Gln596Leu únicamente induce deformaciones sutiles pero significativas en la estructura secundaria. En cambio, se observan cambios más drásticos en el mutante Gln596Ala. Para extraer conclusiones más cuantitativas de las alteraciones estructurales, se procesó el espectro CD con el programa BeStSel^{362,363}. De acuerdo con los datos obtenidos, el contenido de hélices α para la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* a 20 °C era de un 38%, mientras que para los mutantes Gln596Leu (35%) y Gln596Ala (28%) se obtuvieron valores inferiores (Tabla 12). Para el mutante Gln596Ala, la disminución en el contenido de hélices α fue paralela a un aumento significativo en el contenido de láminas β y giros β (un incremento del 8% cuando se compara con la enzima *wild-type*) tanto a 20 °C como a 37 °C.

En un segundo conjunto de experimentos basados en medidas de fluorescencia dinámica se exploraron las alteraciones inducidas por las mutaciones en la estructura terciaria. A partir del tratamiento de estos datos, se ha podido concluir que ambos mutantes muestran una heterogeneidad estructural más pronunciada a todas las temperaturas y que el mutante Gln596Leu presenta una mayor flexibilidad estructural, todo esto en comparación con la enzima *wild-type*.

Tabla 12. Análisis de la estructura secundaria de las variantes *wild-type* y mutantes de la 15-LOX de conejo a diferentes temperaturas. A temperaturas más elevadas se observó una pérdida del contenido de hélice α para todas las muestras.

Estructura secundaria	15-LOX <i>wild-type</i>		Q596L		Q596A	
	T=20°C	T=37°C	T=20°C	T=37°C	T=20°C	T=37°C
α (%)	38	34	35	31	28	25
β (%)	36	37	36	38	43	45
Otros (%)	26	29	29	31	29	30

6.3.2.6 Simulaciones de MD de los complejos enzima-sustrato

Para explorar la base estructural de las diferencias cinéticas observadas entre las diferentes variantes de la enzima, primero se realizaron estudios de *docking* de los sustratos. Se observó que el AA podía adoptar diferentes poses en el centro activo del conformero B. En estos complejos, el grupo carboxilato del sustrato interacciona con Gln596 (sistema Gln596_AA) o con Arg403 (sistema Arg403_AA). Se seleccionó la mejor pose del *docking* para cada modo de unión como las coordenadas iniciales de una simulación de MD de 100 ns del complejo dimérico 15-LOX-1-AA. A continuación, se empleó el mismo protocolo de *docking* para encontrar un modelo estructural de la interacción entre 19-HETE y 15-LOX-1 donde, otra vez, se utilizó el conformero B de la 15-LOX-1 de conejo. En las mejores soluciones de *docking* para este sustrato, su grupo carboxilato interaccionaba tanto con Gln596 (sistema Gln596_19-HETE) como con Arg403 (sistema Arg403_19-HETE). De manera similar al sustrato anterior, se emplearon las coordenadas de estos complejos para realizar las simulaciones de MD. A lo largo de dichas simulaciones para los dos sustratos se analizaron los puentes de hidrógeno que establecía Gln596 del monómero B (Tabla 13).

Las conclusiones más relevantes desde un punto de vista funcional extraídas a partir de nuestras simulaciones se pueden resumir como sigue: 1) los átomos tanto del esqueleto como de la cadena lateral de Gln596 forman puentes de hidrógeno con otros aminoácidos durante una parte significativa de la trayectoria; 2) cuando el AA actuaba como sustrato, los puentes de hidrógeno entre Gln596 y el átomo de oxígeno del esqueleto de Ser592, por un lado, y entre Gln596 y la cadena lateral de Arg599 de la hélice α 18 del conformero B, por otro, mostraban una alta ocupación (Tabla 13). En cambio, esta ocupación disminuía considerablemente o desaparecía empleando 19-HETE como sustrato (Figura 54); 3) cuando el AA actuaba como sustrato en el sistema Arg403_AA, un puente de hidrógeno entre Gln596 y el átomo de oxígeno del esqueleto de Asp174 (24% de ocupación) era visible (panel B de la Figura 54). Dicho Asp forma parte de la hélice α 2 del conformero B; 4) en la trayectoria correspondiente al sistema Arg403_19-HETE, el grupo carboxilato del sustrato permanece unido a la Arg403. Además, existen puentes de hidrógeno directos entre Gln596 y Asp174 (45% de ocupación), por un lado, y entre Gln596 y Ser178 (39% de ocupación), por otro. Otra vez, ambos residuos forman parte de la hélice α 2 del conformero B (panel D de la Figura 54); 5) cuando el AA actuaba como sustrato en el sistema Gln596_AA, también se formaba un puente de hidrógeno entre Gln596 y el

Tabla 13. Análisis de los puentes de hidrógeno de Gln596 del confórmero B con el sustrato (AA o 19-HETE) y con otros residuos de la enzima. Los números indican el porcentaje de la trayectoria de MD en que el puente de hidrógeno considerado está formado (ocupación del puente de hidrógeno) para los cuatro sistemas *wild-type*.

Gln596(B)	Par	Monómero	WT 15-LOX_AA		WT 15-LOX_19-HETE	
			Gln596_AA	Arg403_AA	Gln596_19-HETE	Arg403_19-HETE
HN	Ser592-O	B	54%	58%	11%	9%
	Ile593-O	B	-	-	-	5%
OE1 (sc) ^a	Asp174-HN	B	-	-	-	45%
	Arg599-sc ^a	B	55%	74%	-	-
NH2 (sc) ^a	19-HETE-COO ⁻	-	-	-	62%	-
	Ile593-O	B	-	-	8%	-
	Ser178-OG	B	-	-	-	39%
	Ser592-O	B	-	-	-	13%
	Ser191-O	A	33%	-	-	-
	AA-COO ⁻	-	4%	-	-	-
	Asp174-O	B	-	24%	-	-
	Arg599-HN	B	-	10%	-	-

^asc significa cadena lateral.

átomo de oxígeno del esqueleto de Ser191 (33% de ocupación) donde dicha Ser forma parte de la hélice $\alpha 2$ del confórmero A (panel A de la Figura 54). Estos resultados indican que las hélices α de los dos monómeros que forman la interfase del dímero pueden interactuar entre sí vía Gln596; 6) cuando 19-HETE actuaba como sustrato, no se detectó puente de hidrógeno alguno entre Gln596 y cualquiera de los residuos que constituyen la hélice $\alpha 2$ del confórmero A; 7) para el sistema Gln596_AA, el grupo carboxilato del AA sólo interactúa con Gln596 en el 4% de los *frames* de la simulación de MD. En cambio, para el sistema Gln596_19-HETE, nuestra simulación de MD indica (panel C de la Figura 54) que la interacción entre el grupo carboxilato de 19-HETE y Gln596 se conserva a lo largo de todo el período de la simulación (62% de ocupación). Comparando la k_{cat} de 19-HETE en la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* con la de su mutante Gln596Glu, se determinó que la velocidad de conversión de 19-HETE se redujo enormemente (sólo $3.6 \pm 2.2\%$ de la velocidad de conversión de 19-HETE medida para la enzima *wild-type*) al emplear el mutante Gln596Glu como catalizador. Este resultado es consistente con las predicciones realizadas en base a nuestras simulaciones de MD; 8) en todas las simulaciones de los sistemas, Gln596 se encuentra siempre solvatada pero el grado de solvatación depende del sistema (Tabla 14). Sorprendentemente, el grado de solvatación de Gln596 era mayor cuando interactuaba con el grupo carboxilato de 19-HETE (sistema Gln596_19-HETE) (panel C de la Figura 54) y cuando interactuaba con Arg599 (sistema Gln596_AA) (panel A de la Figura 54); 9) en la trayectoria del sistema Gln596_19-HETE, el grupo carboxilato de 19-HETE interactúa con Gln596 (ver punto 8), que a su vez interactúa con el átomo de oxígeno del esqueleto de Ser178,

que forma parte de la hélice $\alpha 2$ del conformero B (panel C de la Figura 54). De esta manera, en presencia del sustrato, Gln596 interacciona de manera indirecta con la hélice $\alpha 2$ del conformero B.

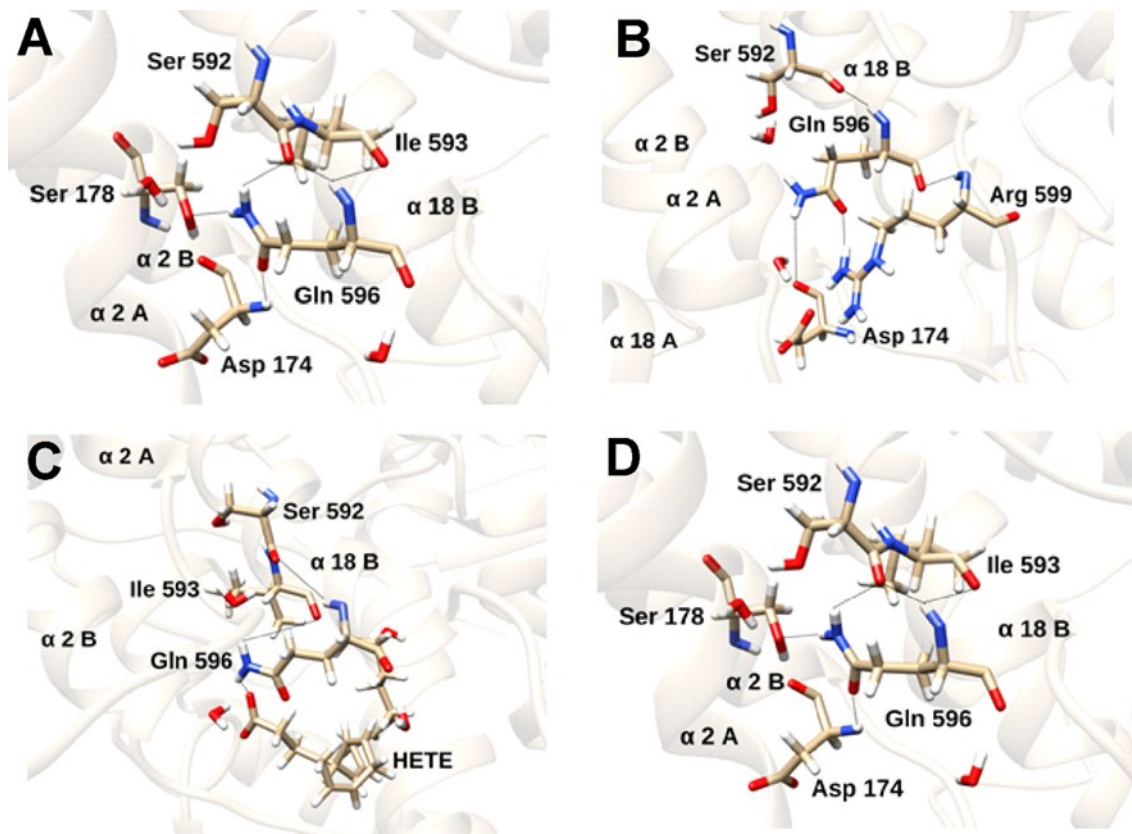


Figura 54. Representación de los puentes de hidrógeno (indicados con líneas negras) más poblados de Gln596 a lo largo de las diferentes simulaciones de MD: sistema Gln596_AA (panel A); sistema Arg403_AA (panel B); sistema Gln596_19-HETE (panel C); sistema Arg403_19-HETE (panel D).

Tabla 14. Número de puentes de hidrógeno promedio entre Gln596 del conformero B y moléculas de agua para los diferentes sistemas.

Sistema	Número de puentes de hidrógeno promedio
Gln596_19-HETE	2.22
Arg403_19-HETE	1.07
Gln596_AA	2.13
Arg403_AA	1.40

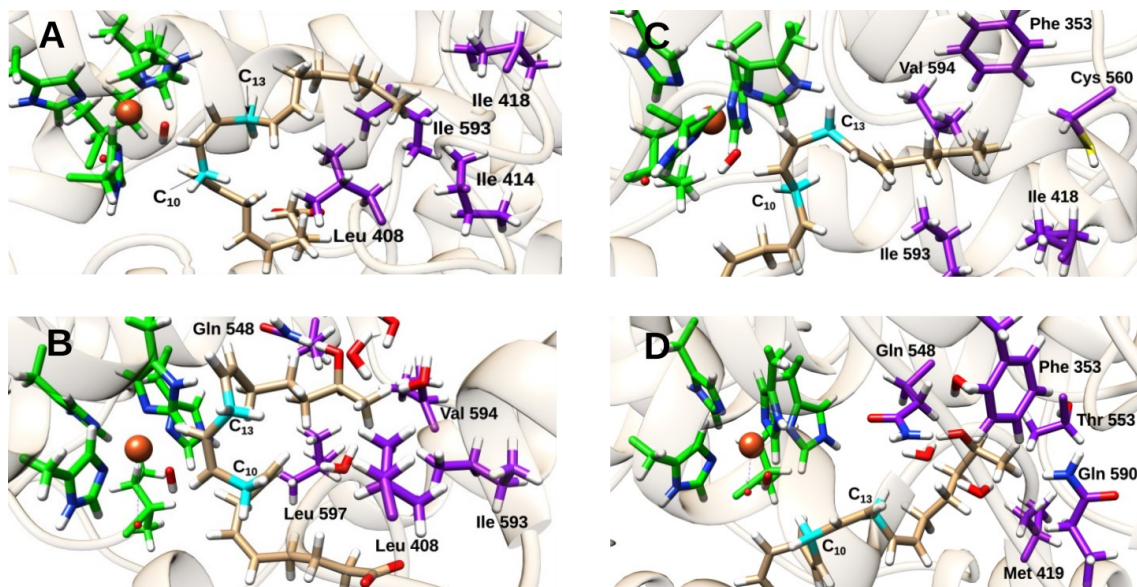


Figura 55. Representación del entorno alrededor del extremo hidrofóbico del sustrato para los sistemas estudiados. Entorno alrededor del extremo hidrofóbico del AA para el sistema Gln596_AA (panel A); Entorno alrededor del extremo hidrofóbico del AA para el sistema Arg403_AA (panel B); Entorno alrededor del extremo hidrofóbico del 19-HETE para el sistema Gln596_AA (panel C); Entorno alrededor del extremo hidrofóbico del 19-HETE para el sistema Arg403_AA (panel D). Se ha representado el sustrato (AA o 19-HETE), la esfera de coordinación del Fe y los residuos que se encuentran a menos de 3 Å del extremo hidrofóbico del sustrato por medio de *sticks*. La esfera de coordinación del Fe se ha resaltado en verde, mientras que los residuos que se encuentran a menos de 3 Å del extremo hidrofóbico del sustrato se han resaltado en lila.

Las principales diferencias locales que se pueden observar entre el AA (paneles A y B de la Figura 55) y el 19-HETE (paneles C y D de la Figura 55) alrededor de sus extremos hidrofóbicos son que el 19-HETE interacciona con Gln548 del monómero B (Gln548B) por medio de su grupo hidroxilo. Hay también algunas moléculas de agua adicionales alrededor de los átomos que están involucrados en dicha interacción, las cuales permanecen cerca del grupo hidroxilo a lo largo de las simulaciones de MD que involucran al 19-HETE como sustrato. Debido a que 19-HETE está unido mediante puentes de hidrógeno tanto por su extremo hidrofóbico (con Gln548B) como por su extremo hidrofílico (con Gln596) en la mayor parte de la trayectoria correspondiente al sistema Gln596_19-HETE, dicho sustrato se encuentra más rígidamente unido que el AA. Además, su interacción con Gln596 parece evitar interacciones directas entre las hélices $\alpha 18$ y $\alpha 2$ del conformero B, constituyentes de la interfase, vía Gln596, todo esto al menos en comparación con los otros tres sistemas (Tabla 13 y Figura 54). Este modo de unión más rígido sugiere que en promedio el C₁₀ y el C₁₃ de 19-HETE distan más del átomo de hierro catalítico que los correspondientes átomos de carbono del AA. De hecho, un análisis de distancias comparativo de los metilenos bisalílicos de AA (Tablas 15 y 16) y 19-HETE (Tablas 17 y 18) que contienen los átomos de carbono C₁₀ y C₁₃ en relación al cofactor Fe(III)-OH⁻ lo corrobora. Este resultado es congruente con la menor actividad de 19-HETE como sustrato de la 15-LOX en comparación con el AA, ya que dichas distancias

Tabla 15. Distancias promedio del C₁₀ y sus átomos de hidrógeno H_{10proR} y H_{10proS} del AA junto con el porcentaje de estructuras con al menos un átomo de hidrógeno bien orientado para su abstracción y el porcentaje de estructuras precatalíticas.

Sistema	d(C ₁₀ -OH) (Å)	d(H _{10proR} -OH) (Å)	d(H _{10proS} -OH) (Å)	Estructuras con al menos un H bien orientado (%)	Estructuras precatalíticas (%)
Gln596_AA	4.01	3.90	4.18	63.8	38.3
Arg403_AA	3.64	3.81	3.05	95.8	75.0

Tabla 16. Distancias promedio del C₁₃ y sus átomos de hidrógeno H_{13proR} y H_{13proS} del AA junto con el porcentaje de estructuras con al menos un átomo de hidrógeno bien orientado para su abstracción y el porcentaje de estructuras precatalíticas.

Sistema	d(C ₁₃ -OH) (Å)	d(H _{13proR} -OH) (Å)	d(H _{13proS} -OH) (Å)	Estructuras con al menos un H bien orientado (%)	Estructuras precatalíticas (%)
Gln596_AA	4.90	5.05	4.90	82.8	4.5
Arg403_AA	5.19	4.85	5.47	97.8	3.4

Tabla 17. Distancias promedio del C₁₀ y sus átomos de hidrógeno H_{10proR} y H_{10proS} del 19-HETE junto con el porcentaje de estructuras con al menos un átomo de hidrógeno bien orientado para su abstracción y el porcentaje de estructuras precatalíticas.

Sistema	d(C ₁₀ -OH) (Å)	d(H _{10proR} -OH) (Å)	d(H _{10proS} -OH) (Å)	Estructuras con al menos un H bien orientado (%)	Estructuras precatalíticas (%)
Gln596_19-HETE	5.16	5.44	6.05	21.7	0.1
Arg403_19-HETE	6.41	5.61	6.97	96.5	0.0

Tabla 18. Distancias promedio del C₁₃ y sus átomos de hidrógeno H_{13proR} y H_{13proS} del 19-HETE junto con el porcentaje de estructuras con al menos un átomo de hidrógeno bien orientado para su abstracción y el porcentaje de estructuras precatalíticas.

Sistema	d(C ₁₃ -OH) (Å)	d(H _{13proR} -OH) (Å)	d(H _{13proS} -OH) (Å)	Estructuras con al menos un H bien orientado (%)	Estructuras precatalíticas (%)
Gln596_19-HETE	5.70	6.39	5.82	23.1	11.7
Arg403_19-HETE	6.92	5.98	6.97	100.0	0.0

permiten hacer una estimación de la probabilidad con la que se producirá la abstracción de hidrógeno del correspondiente átomo de carbono. A partir de las Tablas 15 y 16 se puede apreciar que en los sistemas donde el AA es el sustrato y la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* es la enzima, la distancia promedio C₁₀-OH es más pequeña que la distancia C₁₃-OH. Además, uno de los dos átomos de hidrógeno está en promedio más cerca del átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ que el correspondiente átomo de carbono, mientras que el otro átomo de hidrógeno se encuentra más lejos. También se puede ver que cuando el grupo carboxilato del sustrato está interaccionando con Arg403 (sistema Arg403_AA), aumenta la proporción de estructuras donde al menos uno de los dos átomos de hidrógeno está bien orientado para el proceso de abstracción en relación con el sistema Gln596_AA donde el grupo carboxilato del sustrato se encuentra inicialmente interaccionando con Gln596. Por otra parte, para el sistema Gln596_AA, la distancia entre C_{10/13} y el átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ fluctúa más que para el sistema Arg403_AA y en ambas simulaciones de MD para dichos sistemas hay *snapshots* donde el C₁₃ se encuentra más cerca del átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ que el C₁₀ y viceversa (paneles A y B de la Figura 56). Si se analizan las estructuras precatalíticas, las cuales vienen definidas por los dos siguientes criterios: 1) $d(\text{C}_{10/13}\text{-OH}) \leq 3.0 \text{ \AA}$; 2) $d(\text{H}_{10/13}\text{-OH}) < d(\text{C}_{10/13}\text{-OH})$ de manera que queda asegurado que el correspondiente enlace C-H está adecuadamente orientado para la abstracción de hidrógeno, se puede apreciar que el C₁₀ del AA parece ser más reactivo que el C₁₃. Este resultado es similar al que se obtuvo en unas simulaciones previas de nuestro grupo para el complejo entre AA y la 15-LOX-1 de conejo donde sólo se empleaba el monómero B en el modelo²⁷¹. A pesar del hecho de que ambas abstracciones de hidrógeno parecen ser viables, este resultado está aparentemente en desacuerdo con la regioselectividad experimental de la 15-LOX-1 de conejo *wild-type*. Sin embargo, a partir de dichos cálculos previos²⁷¹ se determinó que la abstracción de H₁₀ está desfavorecida en comparación con la abstracción de H₁₃ debido al impedimento estérico producido por las voluminosas cadenas laterales de Leu597 y/o Ile663. Dichos residuos dificultan significativamente la evolución geométrica que el AA necesita experimentar a lo largo de la abstracción de H₁₀, pero no tienen efecto alguno cuando se transfiere el H₁₃. Esto origina barreras de energía potencial algo mayores para la abstracción de H₁₀ en comparación con la abstracción de H₁₃, explicando así la estricta regioespecificidad del primer paso de la hidroperoxidación del AA catalizada por la 15-LOX-1 de conejo *wild-type*. Por otra parte, para el 19-HETE, se puede apreciar que, a diferencia del AA, su C₁₀ no es reactivo en lo más mínimo, mientras que su C₁₃ únicamente muestra algo de reactividad cuando el grupo carboxilato está interaccionando con Gln596.

A diferencia de los datos obtenidos para los complejos formados entre el AA y la 15-LOX-1 de conejo *wild-type*, en las simulaciones de MD del sistema mutante Q596A_AA, el C₁₃ del ácido graso se aproxima más al átomo de hierro catalítico del cofactor Fe(III)-OH⁻ que el C₁₀. De hecho, el promedio de la distancia $d(\text{C}_{13}\text{-OH})$ es de 3.78 Å, mientras que el promedio de la distancia $d(\text{C}_{10}\text{-OH})$ es de 6.03 Å cuando se calcula sobre la totalidad de la trayectoria de 100 ns o de 5.50 Å cuando se calcula sobre los últimos 50 ns donde el sistema ya está estable (Figuras 56 y 57). Aunque ambas distancias promedio presentan algunas fluctuaciones (panel C de la Figura 56), el C₁₃ se encuentra más cerca del átomo de hierro catalítico del cofactor Fe(III)-OH⁻ durante la mayor parte de la

simulación de MD. A pesar de que el modelo mutante del sistema Q596A_AA no refleja todas las alteraciones observadas en la estructura secundaria para el mutante Gln596Ala, los datos obtenidos todavía están cualitativamente de acuerdo con el aumento en la producción de 15-HETE determinado experimentalmente (Tabla 11).

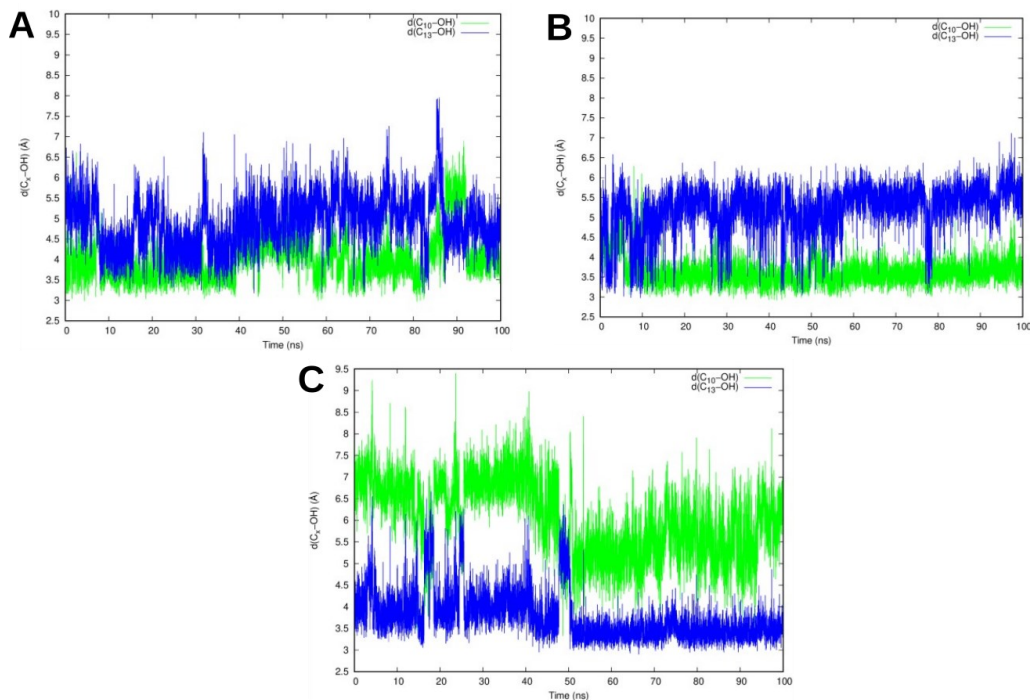


Figura 56. Distancias entre C_{10/13} del AA y el átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ en función del tiempo para los sistemas Gln596_AA (panel A), Arg403_AA (panel B) y Gln596Ala_AA (panel C).

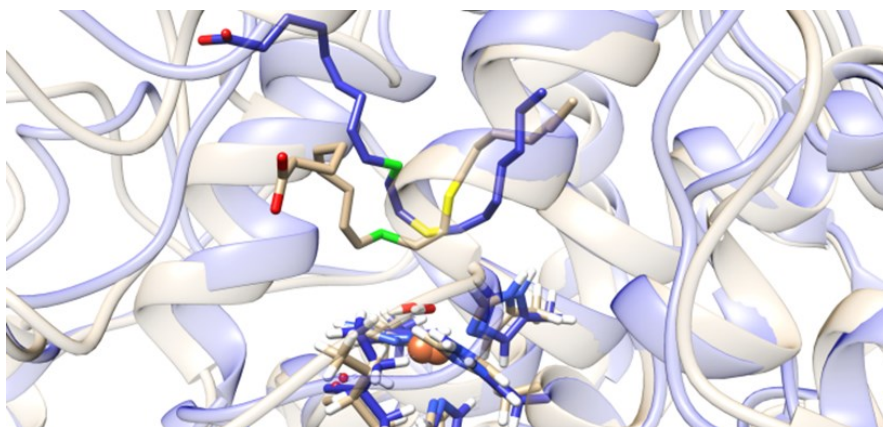


Figura 57. Comparación entre un *snapshot* del complejo WT 15-LOX_AA (en marrón) y un *snapshot* del complejo mutante Gln596Ala_AA (en azul). El C₁₀ está representado en verde, mientras que el C₁₃ está representado en amarillo. Por claridad, no se han incluido los átomos de hidrógeno del AA.

6.3.2.7 Consecuencias de la estructura del sustrato en la geometría de la interfase en el dímero de 15-LOX

Para explorar si las diferencias entre los modos de unión de los dos sustratos (AA y 19-HETE) afectan a la geometría de la interfase del dímero de 15-LOX, se han calculado para los cuatro sistemas diferentes las RMSDs del esqueleto de los elementos de la estructura secundaria involucrados en la dimerización de la proteína (hélices $\alpha 2$ y $\alpha 18$ de los conformeros A y B). Los resultados más relevantes se obtuvieron al comparar los cálculos de las RMSDs del esqueleto de la hélice $\alpha 2$ del conformero B en los sistemas con AA y 19-HETE como ligandos (Figura 58). Los valores de las RMSDs indican un movimiento relativo del esqueleto de la hélice $\alpha 2$ del conformero B cuando se compara el sistema Gln596_AA con el sistema Gln596_19-HETE en cada paso de la trayectoria de MD. Se observó una diferencia similar cuando se compararon los sistemas Arg403_AA y Arg403_19-HETE. De manera interesante, se observó que el movimiento de la hélice $\alpha 2$ del conformero B depende de la estructura del sustrato. Además, las diferencias entre los dos complejos enzima-sustrato alrededor de la hélice $\alpha 2$ del conformero B eran más pronunciadas cuando las trayectorias de MD se habían iniciado con el grupo carboxilato unido a Gln596.

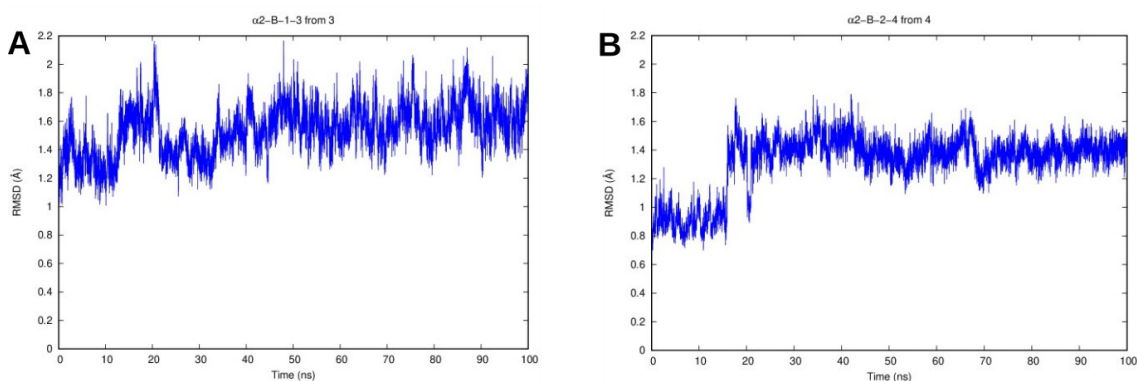


Figura 58. RMSDs para el esqueleto de la hélice $\alpha 2$ del conformero B entre las trayectorias de los sistemas Gln596_AA y Gln596_19-HETE (panel A) y entre las trayectorias de los sistemas Arg403_AA y Arg403_19-HETE (panel B).

En los sistemas Gln596_19-HETE y Arg403_19-HETE, el clúster hidrofóbico formado entre Leu179/Leu183 del monómero A y Leu188/Leu192 del monómero B adopta una conformación que guarda parecido con un motivo *zipper*, el cual también está presente en la estructura cristalográfica dimérica de la 15-LOX-1 de conejo con un inhibidor dentro del monómero B (*PDB code* 2P0M)³⁷. En cambio, en los sistemas Gln596_AA y Arg403_AA, las cadenas laterales de Leu179/Leu183 del monómero A y de Leu188/Leu192 del monómero B están enfrentadas entre sí en la región de la interfase (Figura 59). Estos datos sugieren que la naturaleza del ácido graso del centro activo puede alterar la geometría de la interfase. Más concretamente, éstos sugieren que cuando el AA está unido al centro activo del conformero B, las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 18$ de los dos monómeros interaccionan directamente entre sí. En cambio, cuando el 19-HETE está unido al centro activo del conformero B, el clúster hidrofóbico de la interfase adopta una

conformación diferente de manera que la interacción entre las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 18$ de los dos monómeros es mínima.

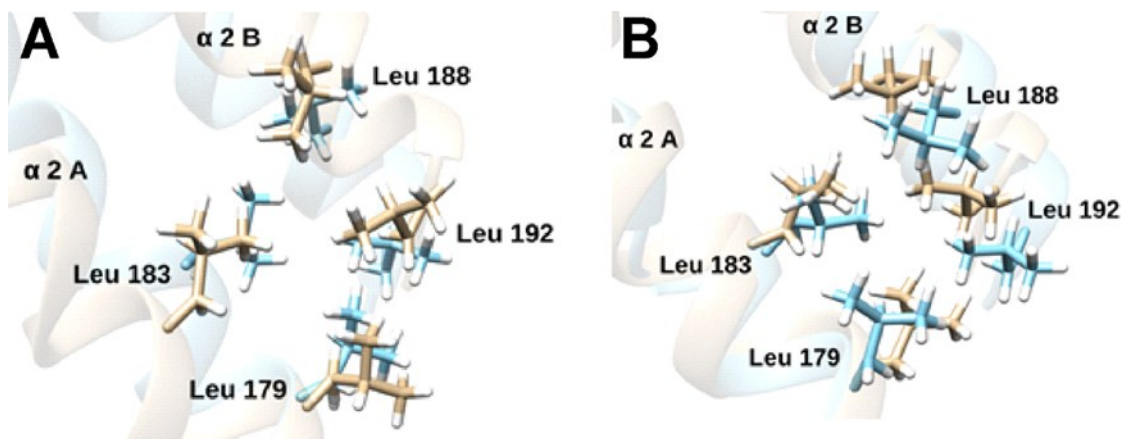


Figura 59. Representación de la conformación del clúster hidrofóbico para los cuatro sistemas estudiados: Superposición de los sistemas Gln596_AA (azul) y Gln596_19-HETE (marrón) (panel A); Superposición de los sistemas Arg403_AA (azul) y Arg403_19-HETE (marrón) (panel B). La hélice $\alpha 2$ de los conformeros A y B ha sido representada mediante *ribbons*, mientras que las cadenas laterales de Leu179(A), Leu183(A), Leu188(B) y Leu192(B) han sido representadas por medio de *sticks*.

6.3.3 Conclusiones

Gln596, la cual se conserva en gran medida en la mayoría de ortólogos de 15-LOX de mamíferos superiores, no contribuye directamente a la geometría del centro activo, ni está involucrada en la unión del AA a éste, sin embargo, sus interacciones indirectas no pueden ser descartadas. De hecho, nuestros estudios por medio de simulaciones de MD (Tabla 13) sugieren que tales interacciones indirectas de Gln596 se dan con residuos que constituyen el centro activo. Además, se ha observado que la introducción de un aminoácido hidrofóbico en esta posición induce ciertas alteraciones funcionales (cinética de reacción, selectividad de sustrato, especificidad de reacción), cosa que indica que Gln596 afecta de manera indirecta a la geometría del centro activo, ayuda a determinar la especificidad de reacción de la enzima y es importante para el carácter alostérico de la oxigenación del AA catalizada por la 15-LOX. Por otra parte, la mutación Gln596Ala induce una pérdida parcial del contenido de hélices α de la 15-LOX-1 de conejo y elimina el carácter alostérico de la enzima. Finalmente, estudios de *docking* de los sustratos y simulaciones de MD utilizando diferentes ácidos grasos como sustrato corroboran que Gln596 puede estar involucrada en la regulación alostérica de la enzima.

6.4 Mecanismo de acción de *N-Substituted 5-(1H-Indol-2-yl)-2-methoxyanilines* que son inhibidores alostéricos de la actividad oxigenasa del LA de las 15-LOX de mamífero

6.4.1 Metodología

En relación con los estudios de *docking*, éstos se realizaron con el programa GOLD5.8.0²⁴⁸. Respecto a los inhibidores **8a** y **8b** (ver Figura 62), estos cálculos se restringieron a la cavidad del monómero A de la 15-LOX-1 de conejo, considerando como receptor la estructura cristalográfica dimérica de dicha enzima (*PDB code* 2P0M)³⁷. Antes de iniciar el protocolo de *docking*, se eliminó el ligando unido al centro activo del monómero B de la estructura cristalográfica. Se generaron las coordenadas de los átomos de hidrógeno con el servidor web H++^{246,247} empleando un pH de 6.0 para los residuos titulables. En cambio, para AA y LA, los cálculos de *docking* se restringieron a la cavidad del monómero B de la 15-LOX-1 de conejo, considerando como receptores los complejos relajados 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B) y 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B). El lugar de unión utilizado en los cálculos de *docking* es una esfera de 20 Å de radio centrada en el átomo de hierro del monómero A, cuando los inhibidores **8a** y **8b** actúan como ligando, o en el átomo de hierro del monómero B cuando AA o LA actúan como ligando. El receptor se mantuvo rígido, pero se le confirió total flexibilidad al ligando durante la exploración conformacional. Se activó la opción de GOLD que considera las interacciones de ligandos orgánicos con iones metálicos en metaloenzimas pero limitando dichas interacciones a las que consideran geometrías hexacoordinadas del átomo de hierro. Se empleó el GA más eficiente para asegurar una exploración conformacional extensiva de todos los ligandos. Para hacer una estimación de las energías de Gibbs de unión de los ligandos se utilizó la función *fitness* ChemScore.

En relación con las simulaciones de MD, los diferentes sistemas se montaron utilizando el procedimiento recomendado por el paquete de programas AMBER²⁴⁹. Para los átomos de proteína se utilizó el *force field* ff14SB²⁵⁰. Los parámetros de *force field* para el AA³²⁵, el LA³⁵⁵ y el átomo de hierro con su primera esfera de coordinación³⁸ (His361, His366, His541, His545, Ile663 y el grupo OH⁻) se recuperaron de trabajos previos, mientras que para este estudio se desarrollaron parámetros específicos de los inhibidores **8a** y **8b**. Los cálculos para generar dichos parámetros específicos se realizaron siguiendo el protocolo estándar de AMBER con los módulos Antechamber y Parmchk2, aunque como ambos inhibidores difieren sustancialmente de los sustratos comunes empleados en AMBER, se tuvo que emplear un procedimiento desarrollado por MacKerell *et al.*³⁶⁴ para subsanar los problemas que presentaban algunos parámetros de los ángulos diedros. Se usó la librería GAFF2^{249,251} como fuente para estos parámetros. Para optimizar las estructuras de los inhibidores **8a** y **8b** se empleó el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) y sus cargas atómicas se asignaron utilizando el procedimiento RESP²⁵² de Merz y Kollman. Además, los estados de protonación para todos los ligandos se establecieron a mano para asegurar que éstos coincidían con el estado de protonación en condiciones fisiológicas.

Todas las simulaciones de MD siguieron el mismo protocolo, las únicas diferencias fueron la longitud del período de producción y las estructuras de partida. Después de combinar los archivos de enzima y sustrato, los diferentes complejos enzima-sustrato se solvataron con una caja ortorrómbica de aguas preequilibradas TIP3P²⁵⁵ y su carga total se neutralizó añadiendo cationes sodio mediante el programa tLeap. Los sistemas resultantes contenían alrededor de 200000 átomos, de los cuales unos 21000 pertenecían a la enzima. Los átomos restantes representan moléculas de agua y cationes sodio. Todas las simulaciones de MD se calcularon con la versión AMBER 18 GPU (CUDA) del paquete de programas PMEMD^{214,256}. En primer lugar, el sistema se sometió a 22000 pasos de minimización de energía utilizando el método *steepest-descent* para evitar malos contactos. En los primeros 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos de proteína y sustrato con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻², de manera que sólo se relajaron el solvente y los iones. En los siguientes 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos del esqueleto proteico y a los átomos pesados del sustrato con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻². En los últimos 10000 pasos, todo el sistema se mantuvo libre de restricciones. Después de esto, se realizaron simulaciones de MD usando PBC. El sistema se calentó gradualmente de 0 K a 300 K durante un período de 200 ps. A continuación, se ha calculado una simulación de MD de 1 ns a temperatura y presión constantes (300 K, 1 bar) para ajustar el volumen de la caja ortorrómbica de manera que la densidad del sistema alcanzara un valor próximo a 1 g cm⁻³. A lo largo del calentamiento y la etapa isobárica, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos del esqueleto proteico y a los átomos pesados del sustrato con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻², mientras que no se aplicó restricción alguna al resto del sistema. La temperatura se controló por medio de dinámica de Langevin²¹⁶, mientras que la presión se ajustó mediante el baróstato de Berendsen²¹⁷. Después, se realizó una etapa de equilibración de 10 ns a temperatura (300 K) y volumen constantes. En último lugar, se calculó un período de producción dentro del mismo colectivo isotérmico-isocórico. A lo largo de toda la trayectoria de MD se empleó un *time step* de 2 fs. Todos los enlaces y ángulos que contenía átomos de hidrógeno se restringieron mediante el algoritmo SHAKE²¹⁵. Las interacciones no enlazantes se calcularon empleando un *cutoff* de 9 Å. La mejor pose de *docking* de **8a** y **8b** en el monómero A se utilizó como estructura de partida para las simulaciones de MD de los complejos 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B) y 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B), respectivamente. La longitud del período de producción para estas dos trayectorias de MD fue de 200 ns para permitir la relajación y adaptación del sistema a la presencia del inhibidor. La última estructura de estas dos simulaciones de MD se empleó como receptor para el *docking* del AA y el LA en el monómero B de los complejos 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B) y 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B). A continuación, la mejor pose de *docking* del AA en el monómero B se seleccionó como estructura de partida para las simulaciones de MD de 15-LOX-**8a**(A)-AA(B) y 15-LOX-**8b**(A)-AA(B). Por otra parte, la mejor pose de *docking* de LA se empleó para iniciar la simulación de MD de los complejos 15-LOX-**8a**(A)-LA(B) y 15-LOX-**8b**(A)-LA(B). En estos casos, se calculó un período de producción de 100 ns excepto para el sistema 15-LOX-**8a**(A)-LA(B) que necesitó 100 ns adicionales para equilibrarse. Para poder comparar, se han incluido los resultados de la simulación de MD del complejo 15-LOX-*empty*(A)-AA(B) (es decir, sin ningún inhibidor) de un estudio previo³⁸. Además, para el

presente trabajo, se ha calculado una simulación de MD de 100 ns para el sistema 15-LOX-*empty*(A)-LA(B) con el objetivo de poder comparar con las simulaciones que incluyen un inhibidor y el LA. El mutante Leu183Glu+Leu192Glu se ha construido a partir del modelo dimérico de 15-LOX *wild-type* utilizando el programa USCF CHIMERA²⁷⁷. Con el objetivo de relajar el sistema que contiene esta doble mutación, se calculó un período de producción más largo, concretamente, de una longitud de 200 ns. Los análisis de las simulaciones de MD se llevaron a cabo con AmberTools18, mientras que la visualización de estas trayectorias se realizó con los programas VMD²⁷⁶ y USCF CHIMERA²⁷⁷. Por último, las superficies de las cavidades se calcularon con el servidor web CavityPlus³⁶⁵.

6.4.2 Resultados

6.4.2.1 Targeted drug design y relación estructura-actividad (SAR) (Resultados experimentales)

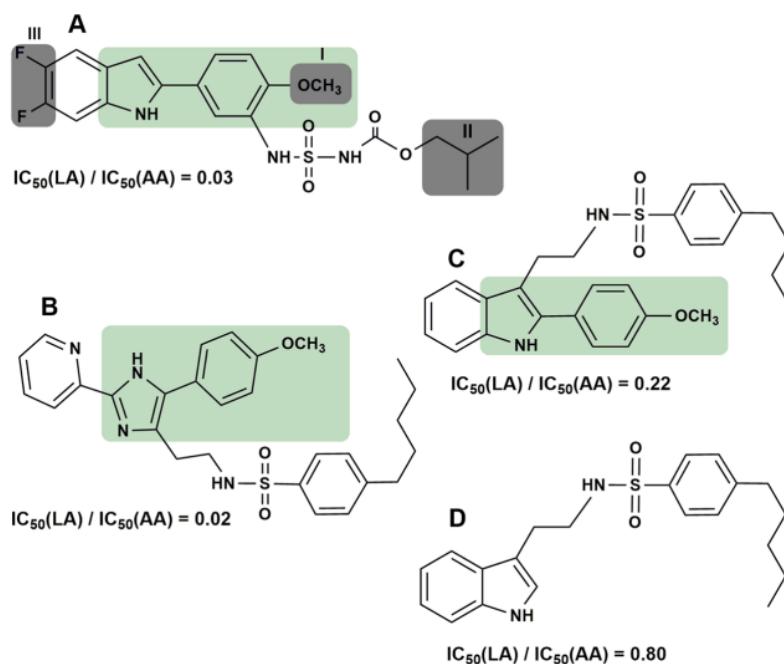


Figura 60. Estructuras seleccionadas de los inhibidores de 15-LOX específicos y no específicos de sustrato.

Como se ha mencionado anteriormente, en solución acuosa, la 15-LOX-1 de conejo exhibe heterogeneidad conformacional³⁹ y a concentraciones de sal fisiológicas está presente en un equilibrio dinámico entre las fracciones monoméricas y diméricas³⁵. Aunque el carácter alostérico de la 15-LOX se conoce desde hace más de una década³³⁷, el mecanismo preciso de regulación alostérica de la enzima sigue sin estar claro. De esta manera, es imposible crear inhibidores alostéricos potentes empleando los métodos convencionales de diseño racional de fármacos. Por otra parte, una búsqueda bibliográfica de inhibidores de la 15-LOX ha revelado que sólo para un número limitado de compuestos se ha determinado el

cociente $IC_{50}(LA)/IC_{50}(AA)^{347-353}$. Para este estudio, se ha cuantificado el valor de IC_{50} de *isobutyl (N-(5-(5,6-difluoro-1H-indol-2-yl)-2-methoxyphenyl)sulfamoyl)carbamate* para la oxigenación del LA y el AA catalizada por la 15-LOX-1 humana recombinante pura (Figura 45) y se obtuvo un cociente de 0.03 (panel A de la Figura 60). El compuesto basado en imidazol *N-(2-(5-(4-methoxyphenyl)-2-(pyridin-2-yl)-1H-imidazole-4-yl)ethyl)-4-pentylbenzenesulfonamide* (panel B de la Figura 60)³⁴⁸ exhibió un grado similar de inhibición específica de sustrato para la 15-LOX-1 de conejo. De manera interesante, la sustitución en la posición 3 del anillo indol (panel C de la Figura 60) redujo el grado de selectividad de sustrato del inhibidor para la 15-LOX-1 de conejo y la ausencia del grupo metoxiarilo eliminó completamente la inhibición específica de sustrato³⁵³. Basándonos en estos datos, se podría concluir que el grupo 2-metoxianilina unido en la posición C₂ del núcleo farmacóforo desempeña un papel crucial en el grado de inhibición específica de sustrato de la actividad oxigenasa de la 15-LOX para el LA. Cuando se realizaron estudios de *docking* del sulfamoilocarbamato representado en el panel A de la Figura 60 en la cavidad del monómero A del dímero de 15-LOX-1 de conejo (*PDB code 2P0M*), se obtuvo que el inhibidor en su mejor pose de *docking* estaba colocado en la cavidad del monómero A con su grupo *5-(1H-indol-2-yl)-2-methoxyaniline* por delante (Figura 61). El grupo éster del ácido carbámico se encontraba próximo a la entrada de la cavidad del monómero A y parcialmente interconectado a los dos monómeros de la enzima dimérica, ya que los átomos de oxígeno de dicho grupo formaban dos puentes de hidrógeno: 1) entre un átomo de oxígeno carboxílico y la cadena lateral de Arg403 (monómero A); 2) entre el otro átomo de oxígeno carboxílico y la cadena lateral de Asn193 (monómero B). El átomo de oxígeno del esqueleto de Arg403 forma puentes de hidrógeno con ambos grupos NH de la sulfonamida. La cadena lateral de Gln596 (monómero A) está dirigida hacia el interior de la cavidad del monómero A y su grupo NH₂ forma dos puentes de hidrógeno con uno de los átomos de oxígeno del grupo sulfonamida. Por otra parte, el grupo metoxilo del inhibidor se encuentra entre Phe175 y Leu179, que forman una especie de pinza alrededor de su grupo CH₃. Aunque ambos residuos se encuentran próximos al grupo metoxilo, Phe175 está a una distancia más corta. Los grupos NH₂ de Arg599 y Arg403 interactúan electrostáticamente con el átomo de oxígeno del grupo metoxilo y el grupo NH₂ de Gln596 forma un puente de hidrógeno con este mismo átomo de oxígeno. Finalmente, merece la pena mencionar que uno de los dos átomos de flúor presenta interacciones electrostáticas desfavorables con Glu357 (Figura 61). Este modo de unión sugiere que la naturaleza química de los sustituyentes I, II y III (panel A de la Figura 60) puede tener una relevancia crucial para las propiedades alostéricas del inhibidor. Basándose en esto, se han propuesto tres líneas de modificación del inhibidor: 1) debido a que el grupo OCH₃ perteneciente al grupo metoxianilina puede limitar la movilidad de este ligando dentro del centro activo, se sustituyó este residuo por un pequeño átomo de hidrógeno; 2) el modo de unión del inhibidor que se identificó con los cálculos de *docking* ofrece suficiente espacio alrededor de la cola del grupo éster del ácido carbámico para la modificación química del sustituyente II. Por consiguiente, se razonó que la incorporación de un grupo éster de cadena alifática larga en esta posición podía incrementar el carácter lipófilo de este sustituyente y, por lo tanto, podía mejorar la afinidad de unión del inhibidor al entorno hidrofóbico de la cavidad del monómero A. Además, la introducción de un grupo éster alilo podría inducir interacciones π - π adicionales entre el inhibidor y los aminoácidos

aromáticos del centro activo y, por lo tanto, se podría fortalecer la interacción enzima-inhibidor; 3) dado que la fluoración del anillo indol puede no sólo mejorar la estabilidad metabólica del farmacóforo respecto la oxidación, sino que también podría ser importante para la alineación del inhibidor en el centro activo de la enzima, se prepararon también los derivados no fluorados y monofluorados en la posición C₅ del inhibidor.

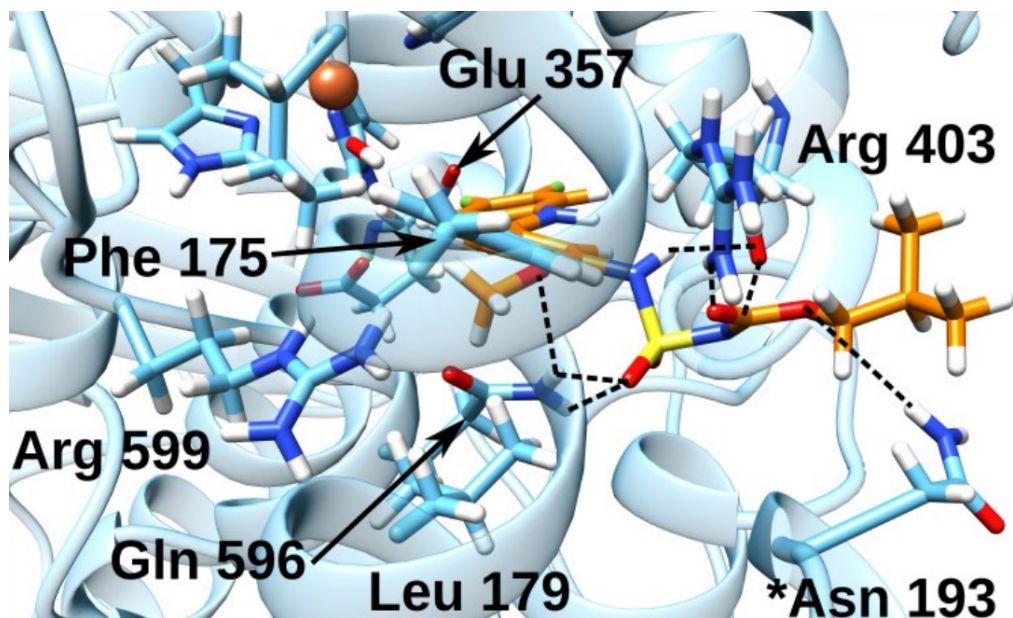


Figura 61. Mejor pose de *docking* de *N*-(5-(5,6-difluoro-1*H*-indol-2-yl)-2-methoxyphenyl)sulfamoyl carbamate en el monómero A del dímero de 15-LOX-1 de conejo (*PDB code* 2P0M). Asn193 está resaltado con un asterisco para indicar que pertenece al monómero B.

6.4.2.2 Síntesis química de *N*-(3-(1*H*-indol-2-yl)phenyl)sulfamoyl carbamates sustituidos (Resultados experimentales)

Para comprobar la validez de nuestras predicciones *in silico*, se ha sintetizado un conjunto de nueve derivados 2-ariloindol que involucran los siguientes precursores: 1) 3-(1*H*-indol-2-yl)aniline (**5a**); 2) 5-(1*H*-indol-2-yl)-2-methoxyaniline (**5b**); 3) el derivado monohalogenado de **5b** (**5c**). La preparación de **5a-c** tanto por la vía de la síntesis de indol de Fischer en un procedimiento de una sola etapa como por la vía que aísla las hidrazonas intermedias **4a-c** (Figura 62, *path B*) conduce a la formación de mezclas complejas de productos con rendimientos pobres para los compuestos objetivo. Sin embargo, utilizando ácido polifosfórico (PPA)³⁶⁶, se consiguió sintetizar los compuestos **5a-c** con buenos rendimientos (50-60%) empleando temperaturas bastante moderadas (120-130 °C) y tiempos de reacción cortos (15-30 min) (Figura 62, *path A*). En último lugar, los indoles resultantes **5a-c** se transformaron posteriormente a los derivados **6-8** por medio de la reacción con clorosulfonilo isocianato y el correspondiente alcohol en presencia de dietilamina³⁵⁰. Cabe destacar que todos los compuestos obtenidos, tanto productos finales como intermedios, se caracterizaron para comprobar su identidad.

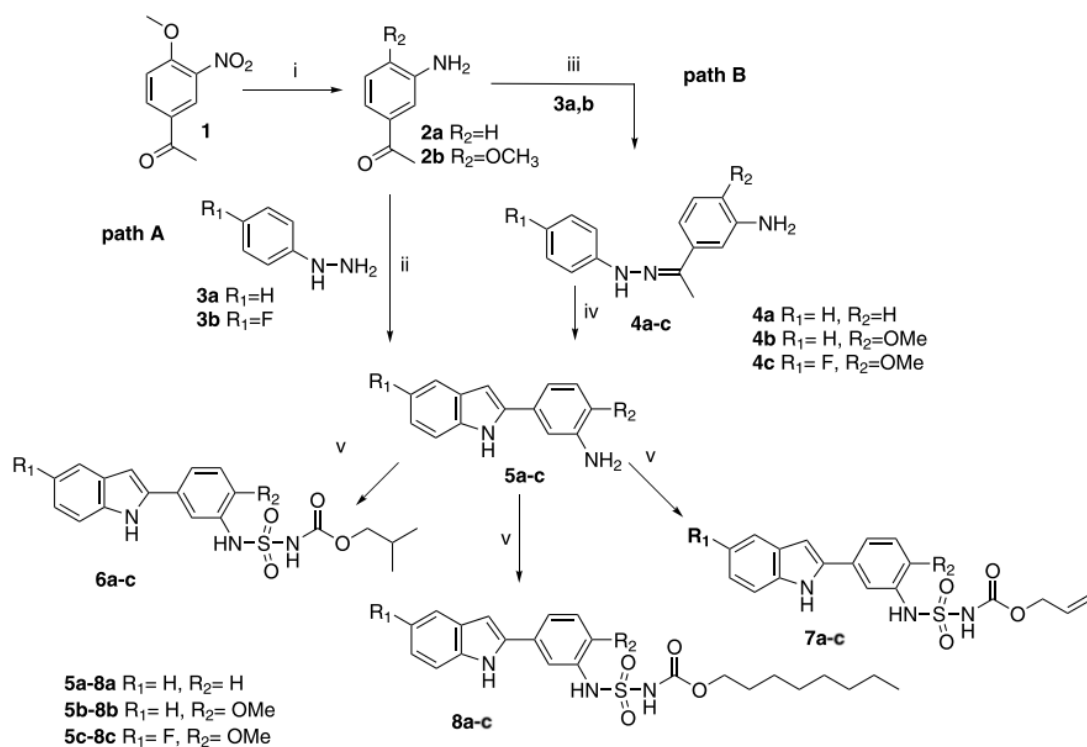


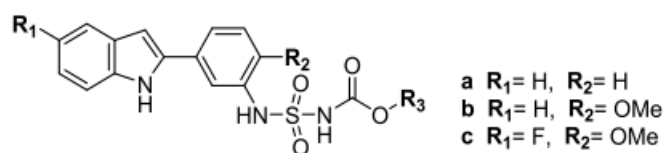
Figura 62. Ruta sintética de los compuestos **6-8**. A continuación se detallan reactivos y condiciones: i) 10% Pd/C, HCOONH₄, EtOH, reflujo; ii) PPA, 130 °C, 0.5 h; iii) AcOH, EtOH, reflujo; iv) ZnCl₂, 180 °C, 2 h; v) ClSO₂NCO, HN(C₂H₅)₂, alcohol isobutílico, alcohol alílico o alcohol octílico, rt.

6.4.2.3 Potencia inhibidora de los *N*-(3-(1*H*-indol-2-yl)phenyl)sulfamoyl carbamates sustituidos (**6-8**) respecto la 15-LOX (Resultados experimentales)

Durante la primera serie de experimentos, se determinaron los valores de IC₅₀ para los nueve compuestos 2-ariloindol derivados de la sección anterior utilizando la 15-LOX-1 de conejo recombinante pura como enzima. La inhibición se midió empleando los experimentos espectrofotométricos estándar que monitorizan la velocidad de formación de dienos conjugados cuando AA o LA se usan como sustratos. Los valores de IC₅₀ oscilan entre 0.04 μM para el LA y > 50 μM para el AA (Tabla 19 y Figura 63). De esta manera, se observó una pronunciada inhibición enzimática específica de sustrato. La comparación de los datos indica que la presencia del grupo metoxilo en C₂ del grupo anilina (indoles tipos **b** y **c**) es importante no sólo para la potencia inhibidora, sino que también para la selectividad de sustrato del efecto inhibitor (cociente IC₅₀(LA)/ IC₅₀(AA) < 0.05). La sustitución del grupo butilo (compuestos **6b/c**) por un grupo alilo (compuestos **7b/c**) resulta en un cambio moderado de la potencia inhibidora de los compuestos. En cambio, la introducción de un sustituyente con un carácter más lipófilo como es el octilo (compuestos **8b/c**) aumentó la potencia inhibidora en 10 veces. La fluoración del anillo indol en C₅ (compuestos **6c-8c**) mejoró de forma moderada la potencia inhibidora contra ambos ácidos grasos, pero no tuvo ningún efecto en la selectividad de sustrato de la inhibición. Por otra parte, los compuestos **8b** (panel A de la Figura 64) y **8c**, con valores

de IC₅₀ de 0.04 μM, parecen ser igual de potentes que los mejores inhibidores de 15-LOX descritos hasta el momento³⁵³. Es importante notar que las condiciones experimentales empleadas en los diferentes estudios que aparecen en la literatura y en nuestros experimentos no son estrictamente comparables (preparados enzimáticos diferentes, concentraciones de sustrato diferentes, uso de detergentes) y, por lo tanto, la comparación directa de los valores determinados para IC₅₀ puede ser engañosa. Sin embargo, lo más interesante es que los compuestos **6c**, **7b/c** y **8b** mostraron un alto grado de selectividad de sustrato con cocientes IC₅₀(LA)/ IC₅₀(AA) oscilando entre 0.014 y <0.030 (Tabla 19 y Figura 63). Además, se observó una tendencia similar para la inhibición específica de sustrato cuando se probó **8b** con la 15-LOX-1 humana recombinante (panel B de la Figura 64).

Tabla 19. Actividad inhibidora de los 2-ariloindolsulfocarbamatos 6-8 respecto a la 15-LOX-1 de conejo.



	6 , R ₃ = -CH ₂ -CH(CH ₃) ₂			7 , R ₃ = -CH-CH=CH ₂			8 , R ₃ = -(CH ₂) ₇ -CH ₃		
Indole Type	IC ₅₀ (LA) (μM) ^a	IC ₅₀ (AA) (μM) ^a	IC ₅₀ (LA)/IC ₅₀ (AA) ratio	IC ₅₀ (LA) (μM) ^a	IC ₅₀ (AA) (μM) ^a	IC ₅₀ (LA)/IC ₅₀ (AA) ratio	IC ₅₀ (LA), (μM) ^a	IC ₅₀ (AA), (μM) ^a	IC ₅₀ (LA)/IC ₅₀ (AA) ratio
a	29.97±12.20	>50	>0.60	15.38±10.20	>50	>0.30	1.55±0.34	2.79±1.53	0.55
b	1.45±0.27	>50	>0.030	0.63±0.32	43.34±13.09	0.014	0.040±0.001	2.06±0.14	0.020
c	0.42±0.03	20.82±2.12	0.020	0.54±0.06	23.26±3.46	0.023	0.047±0.001	1.08±0.06	0.043

^aLos datos se han obtenido en base a las curvas dosis-respuesta de los experimentos espectrofotométricos para determinar la actividad de la 15-LOX-1 de conejo purificada (ver Figura 63). Todos los datos están representados como media ± SEM de tres medidas independientes (n = 3).

La actividad de los diferentes inhibidores puede depender de su estado de agregación en soluciones acuosas debido a su solubilidad limitada en agua³⁶⁷. Para descartar esta posibilidad, se realizaron estudios espectrofotométricos adicionales utilizando una pequeña fracción de solubilizador (panel C de la Figura 64). Se observó que en presencia de detergentes la inhibición específica de sustrato de 15-LOX seguía produciéndose (cociente LA/AA < 0.1). Debido a que los compuestos tensoactivos pueden afectar también la estructura enzimática, se evitó utilizarlos en los siguientes experimentos.

A continuación, se exploró si la 15-LOX de ratón también exhibía una inhibición selectiva de sustrato similar (panel D de la Figura 64). Sin embargo, para dicha 15-LOX no se pudo detectar selectividad de sustrato, cosa que sugiere que **8b** presenta una pronunciada inhibición específica de ortólogo de 15-LOX. Es importante notar que la enzima de ratón carece de Gln en la posición 596, la cual se conserva en numerosos ortólogos de 15-LOX de mamíferos superiores incluyendo conejos y humanos, y en su lugar presenta una Leu.

Debido a que se ha determinado que Gln596 contribuye a las propiedades alostéricas de la 15-LOX-1 de conejo³⁸, podría ser que el intercambio de aminoácidos en esta posición que se produce en la enzima de ratón afecte a sus propiedades alostéricas, modificando el efecto inhibitor de **8b** en dicha enzima.

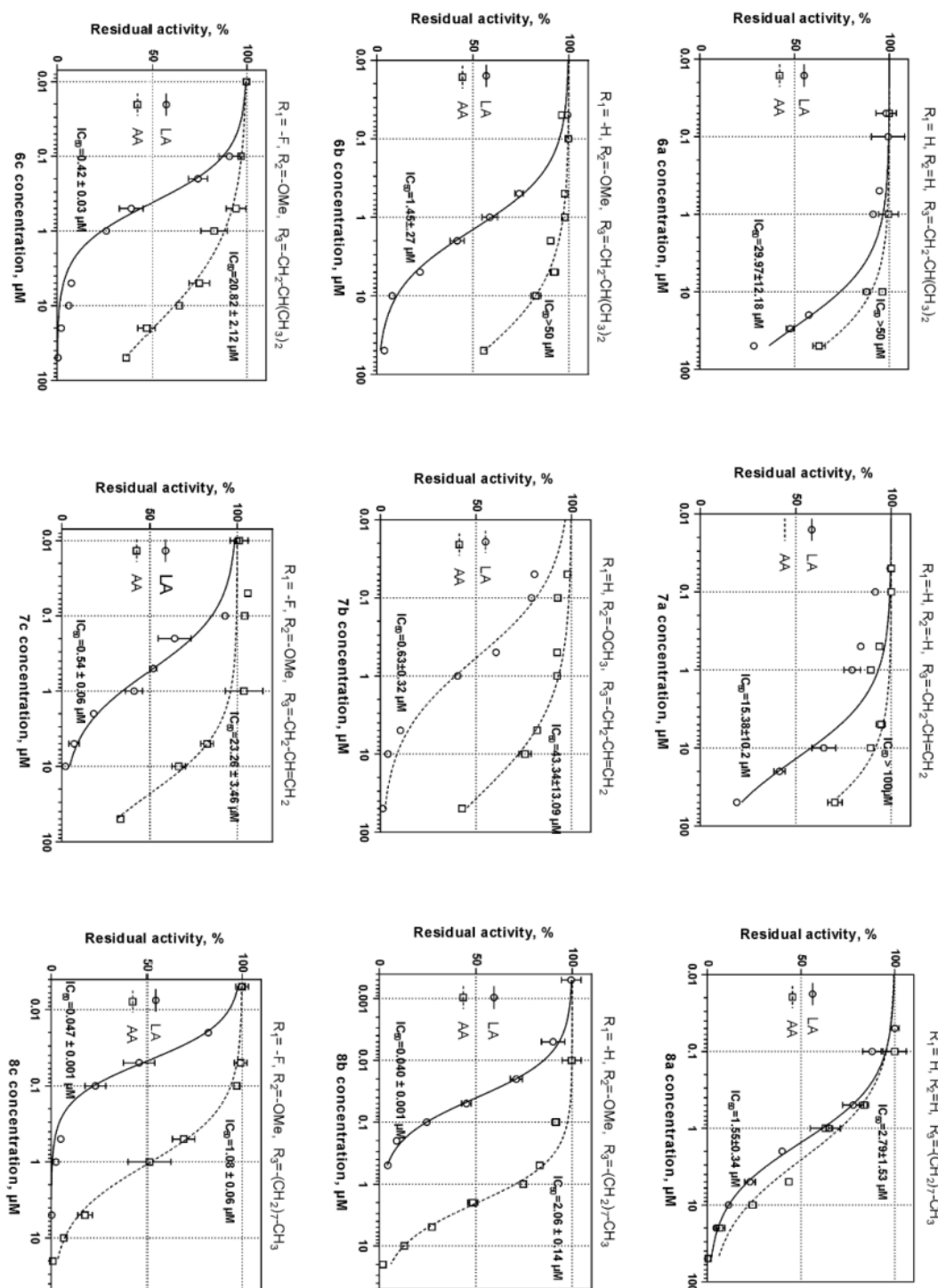


Figura 63. Curvas dosis-respuesta de los compuestos **6-8** obtenidas a partir de experimentos espectrofotométricos que median la actividad de la 15-LOX-1 de conejo recombinante purificada.

En último lugar, se comprobó si la inhibición específica de sustrato de la 15-LOX-1 humana se podía también demostrar en sistemas celulares. Aunque se requirió concentraciones de inhibidor algo mayores para inhibir la actividad celular de la 15-LOX, se observó inhibición preferencial de la actividad oxigenasa del LA para **8b** (cocientes LA/AA 0.14-0.18) (panel E de la Figura 64). Por otra parte, el inhibidor estándar de LOXs y COXs ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ETYA) no mostró un grado mayor de selectividad de sustrato (panel F de la Figura 64). Considerándolo todo, estos datos indican que el efecto inhibitor específico de sustrato de **8b** respecto a la 15-LOX-1 humana se puede observar también para la enzima intracelular.

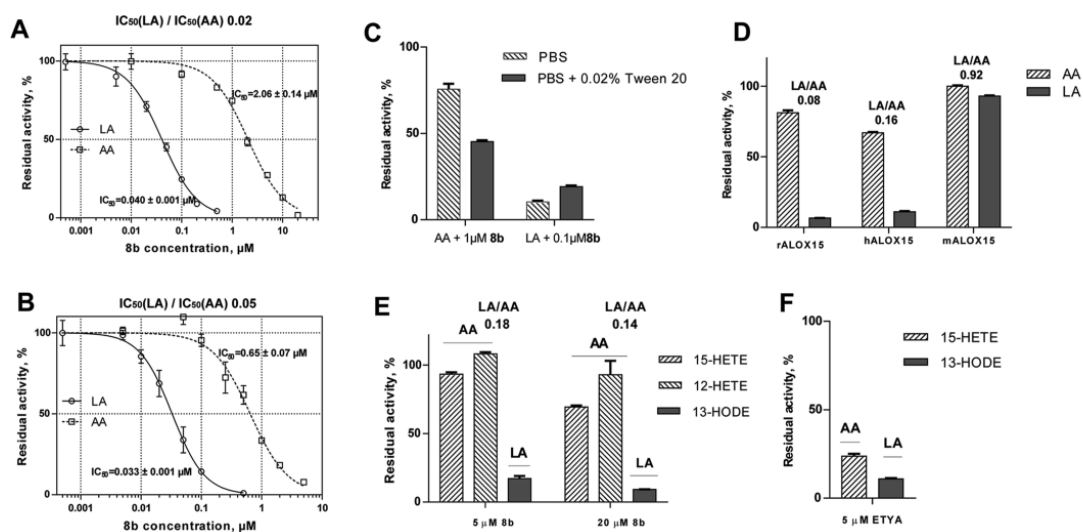


Figura 64. Curvas dosis-respuesta para la inhibición de la actividad oxigenasa de LA y AA mediante el compuesto **8b** para la 15-LOX-1 de conejo recombinante pura (panel A) y la 15-LOX-1 humana recombinante pura (panel B). Efecto del detergente (Tween 20) en la potencia inhibitora de **8b** para la 15-LOX-1 de conejo (panel C). Inhibición de diferentes ortólogos de 15-LOX de mamífero mediante **8b** (panel D). La actividad lipoxigenasa de la muestra que carecía de inhibidor se definió como 100%. Finalmente, se calcularon los cocientes de actividad residual de la oxigenación de LA frente a la oxigenación de AA (formación de 13-HODE frente a formación de 15-HETE) como medida adecuada para la selectividad de sustrato del efecto inhibitor. Inhibición de la 15-LOX-1 humana intracelular por medio de **8b** (panel E). La actividad lipoxigenasa de la muestra que carecía de inhibidor se definió como 100%. Como medida adecuada para la selectividad de sustrato del efecto inhibitor de **8b**, se calcularon los cocientes de actividad residual de la oxigenación de LA frente a la oxigenación de AA (formación de 13-HODE frente a formación de 15-HETE). Inhibición de la 15-LOX-1 humana intracelular mediante 5 μM de ETYA (panel F). El experimento se realizó bajo condiciones estrictamente comparables a las empleadas con **8b**. Todos los datos están representados como media ± SEM de tres medidas independientes (n = 3).

6.4.2.4 Mecanismo de inhibición (Resultados experimentales)

Para explorar el mecanismo de inhibición específica de sustrato de la actividad oxigenasa del LA para la 15-LOX, se realizaron experimentos cinéticos exhaustivos empleado los compuestos **6c** y **8b**, los cuales exhiben un cociente $IC_{50}(LA)/IC_{50}(AA)$ bajo, y la 15-LOX-1 de conejo recombinante pura. Se evaluaron las constantes cinéticas para esta enzima sin inhibidor y se obtuvieron los valores que aparecen a continuación: $k_{cat}^{LA} = 32.5 \pm 1.0 \text{ s}^{-1}$; $K_M^{LA} = 24.5 \pm 5.0 \text{ }\mu\text{M}$; $k_{cat}^{AA} = 21.9 \pm 2.0 \text{ s}^{-1}$; $K_M^{AA} = 13.2 \pm 2.0 \text{ }\mu\text{M}$ para LA y AA, respectivamente. Estos datos son congruentes con estudios previos^{34,38}. Utilizando LA como sustrato, ambos compuestos (**6c** y **8b**) produjeron una marcada disminución de k_{cat} pero los valores de K_M permanecieron prácticamente inalterados. Se ajustaron los datos de estos inhibidores a diferentes modelos de inhibición y se obtuvieron los mejores ajustes para un modelo de inhibición no competitiva de la oxigenación de LA con una K_i de $21.9 \pm 0.5 \text{ nM}$ ($R^2 = 0.977$) para **8b** y una K_i de $0.29 \pm 0.08 \text{ }\mu\text{M}$ ($R^2 = 0.985$) para **6c**. Estos datos sugieren que la unión del LA como sustrato de oxigenación y la unión del inhibidor son procesos independientes, pero el complejo ternario (ESI^{LA}) no puede ser catalíticamente productivo. Dicho esto, es posible tanto que **8b** se una al complejo formado entre la enzima y el LA (ES^{LA}) dando lugar al complejo no productivo ESI^{LA} como que **8b** se una primero a la enzima dando lugar al complejo EI que tampoco sería productivo (mecanismo A de la Figura 65). Utilizando AA como sustrato, **6c** y **8b** provocaron un descenso marcado de los valores de tanto k_{cat} como K_M . Se obtuvo el mejor ajuste para los datos experimentales con un modelo de inhibición anticompetitiva con una K_i de $0.95 \pm 0.06 \text{ }\mu\text{M}$ ($R^2 = 0.989$) para **8b** y una K_i de $6.53 \pm 0.49 \text{ }\mu\text{M}$ ($R^2 = 0.979$) para **6c**. La reducción del valor de K_M comentada anteriormente sugiere una mejor unión entre enzima y sustrato debido a un agotamiento constante del complejo ES^{AA} tras la unión del inhibidor formando el complejo no productivo ESI^{AA} . Estos datos sugieren que el inhibidor puede unirse preferencialmente al complejo ES^{AA} , aunque si se une a la enzima formando el complejo EI, el AA podría no ser capaz de unirse a dicho complejo debido a restricciones conformacionales (mecanismo B de la Figura 65).

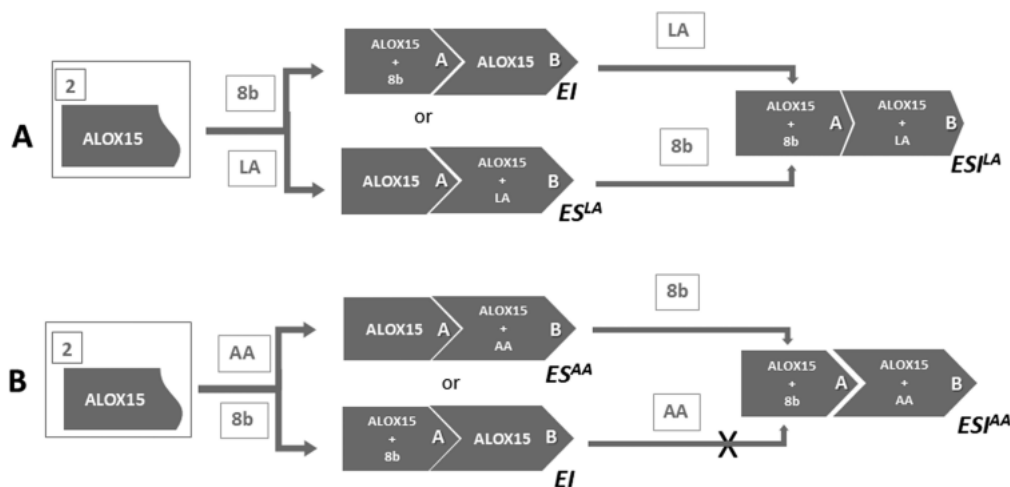


Figura 65. Representación esquemática de los mecanismos de acción propuestos para **8b**.

Por otra parte, la inhibición de ambos sustratos por el compuesto **8a** puede ser descrita mediante un modelo de inhibición mixto ($R^2 = 0.977$) con una K_i de $0.79 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ($\alpha = 6.6$) y una K_i de $3.13 \pm 0.40 \mu\text{M}$ ($\alpha = 7.9$) para el LA y el AA, respectivamente. En este caso, los cocientes de las constantes de disociación K_d^{EI} y K_d^{ESI} eran de 0.075 y 0.153 para LA y AA, respectivamente. Esto sugiere una mayor afinidad de unión de **8a** respecto a la enzima (E) en vez de respecto al complejo enzima-sustrato (ES).

A continuación, se probó la reversibilidad de la inhibición mediante **8b** de la oxigenación de LA catalizada por 15-LOX. Se concluyó que **8b** presenta un modo de acción reversible y que en promedio una molécula de dicho compuesto se une a una molécula de enzima. Se obtuvieron datos similares para el compuesto **6c**.

En general, los sulfamiloilcarbamatos pueden degradarse en soluciones acuosas acidas en presencia de Fe^{3+} . Esta reacción se asocia a la reducción de los iones férricos Fe^{3+} a la forma ferrosa divalente Fe^{2+} . Se pueden excluir las reacciones de descomposición específicas de sustrato del inhibidor, ya que no ocurre degradación alguna del inhibidor durante la catálisis enzimática con ambos sustratos (AA o LA). Además, la preincubación del complejo 15-LOX-**8b** con grandes cantidades de peróxidos orgánicos (13-HpODE, 20 μM) no afectó a la actividad inhibidora. Estos datos excluyen la posibilidad de que la inhibición enzimática específica de sustrato pueda estar relacionada con las propiedades redox de los inhibidores.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, los datos indican que los compuestos **8b** y **6c** inhiben la oxigenación de LA y AA catalizada por la 15-LOX-1 de conejo de manera reversible mediante diferentes mecanismos alostéricos. En cambio, **8a** tiende a competir con ambos sustratos por la unión al centro activo.

6.4.2.5 Efecto de los inhibidores en el patrón de productos de la 15-LOX (Resultados experimentales)

Las 15-LOXs humana y de conejo exhiben una especificidad de reacción dual donde el AA es convertido por estas dos enzimas a una mezcla de 15-HETE y 12-HETE (90:10 para la enzima humana y 95:5 para la enzima de conejo). Dicho esto, se exploró si **8a** y **8b** alteraban la especificidad de reacción de la enzima de conejo. Se observó que ambos inhibidores no modificaban el patrón de productos de la oxigenación de AA incluso a altas concentraciones de inhibidor. Independientemente de la concentración de inhibidor, siempre se cuantificó en la mezcla del experimento una proporción 15-HpETE/12-HpETE de $95.5 \pm 0.2\%/4.5 \pm 0.2\%$ (gráfico de la izquierda de la Figura 66). Previamente, se había reportado un patrón de productos similar para esta enzima en ausencia de cualquier inhibidor³⁶¹. Sin embargo, **8b** produjo alteraciones sutiles en la especificidad de producto de la oxigenación de LA. Cuando se utilizó el mutante Ile418Ala de la 15-LOX-1 de conejo que oxigena al AA en posición 12 para realizar experimentos comparativos (gráfico central de la Figura 66), se confirmó que esta variante de la enzima oxigena al AA predominantemente a 12-HpETE y únicamente se detectó una proporción menor de 15-HpETE (25%). La presencia de **8a** no alteró este patrón de productos, sin embargo, **8b** redujo la proporción relativa de 12-HpETE en comparación con el control que no contenía inhibidor (gráfico central de la Figura 66). Otra vez, las alteraciones inducidas por el

inhibidor en la especificidad de productos eran bastante sutiles pero significativas desde un punto de vista estadístico. Con 15-LOX-1 humana como catalizador, se observó que tanto **8a** como **8b** reducían la proporción relativa del producto de oxigenación mayoritario (15(*S*)-HpETE) en comparación con los controles que no contenían inhibidor (gráfico de la derecha de la Figura 66). Es decir, la presencia de **8a** o **8b** hace que la enzima humana permita al AA adoptar en el centro catalítico una conformación diferente, la cual favorece ligeramente la oxigenación del AA en la posición 12. Las diferencias observadas entre la 15-LOX humana y la 15-LOX de conejo pueden deberse a diferencias estructurales entre ambas enzimas, las cuales provendrían del hecho de que las secuencias de aminoácidos de estas enzimas no son totalmente idénticas, sino que comparten un 71% de identidad. Teniendo todo en cuenta, estos datos muestran que algunos de nuestros inhibidores provocan alteraciones bastante sutiles pero significativas desde un punto de vista estadístico en la especificidad de productos de 15-LOX, las cuales pueden ser consideradas como una indicación de la interacción entre enzima e inhibidor.

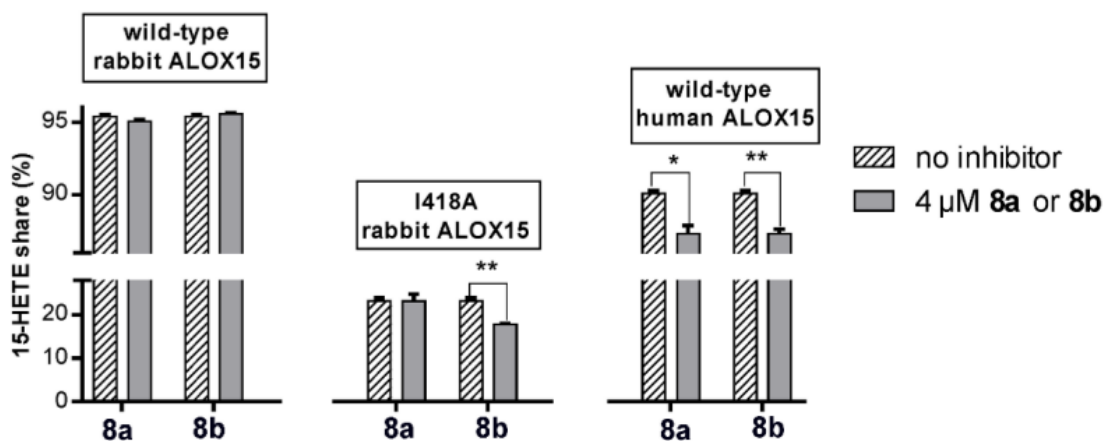


Figura 66. Efecto del inhibidor en la especificidad de productos de la 15-LOX-1 de conejo (gráfico de la izquierda), su mutante Ile418Ala (gráfico central) y la 15-LOX-1 humana (gráfico de la derecha).

6.4.2.6 Efecto de la doble mutación Leu183Glu+Leu192Glu en la oxigenación del LA

En un estudio previo de nuestro grupo³⁴, se ha mostrado que Leu183 y Leu192, las cadenas laterales de las cuales están orientadas hacia fuera en la enzima monomérica, son importantes para la integridad de la interfase del dímero de 15-LOX-1 de conejo observado en la estructura cristalográfica (*PDB code* 2P0M). La mutación de estos residuos a glutamatos cargados negativamente (mutante Leu183Glu+Leu192Glu) afecta al modo de autoasociación de la enzima, cosa que modifica sus propiedades catalíticas (inhibición de sustrato por encima de 10 μM). En esta tesis, se ha creado un modelo estructural *in silico* para el doble mutante Leu183Glu+Leu192Glu de la 15-LOX-1 de conejo y se ha realizado una simulación de MD de 200 ns con éste. Los resultados muestran que His585(A), Trp181(B) y His585(B) forman una red de interacciones π - π , aunque ésta es bastante débil. El clúster de aminoácidos hidrofóbicos que estabiliza la

interacción intermonómero de la enzima *wild-type* se ha desmontado. En el doble mutante, Leu188(B) se ha apartado y apunta hacia afuera. Leu179(A) también se ha apartado, pero todavía apunta hacia dentro de la interfase. Glu183(A) y Glu192(B) forman un puente salino con Lys189(B). Trp181(A) se ha movido hacia fuera de la interfase y no va a contribuir más a la interacción intermonómero. En el dímero de 15-LOX-1 de conejo *wild-type*, las hélices $\alpha 2(A)$ y $\alpha 2(B)$ son paralelas entre sí, mientras que en el doble mutante Leu183Glu+Leu192Glu estas hélices dejan de estar dispuestas de manera paralela (paneles A y B de la Figura 67).

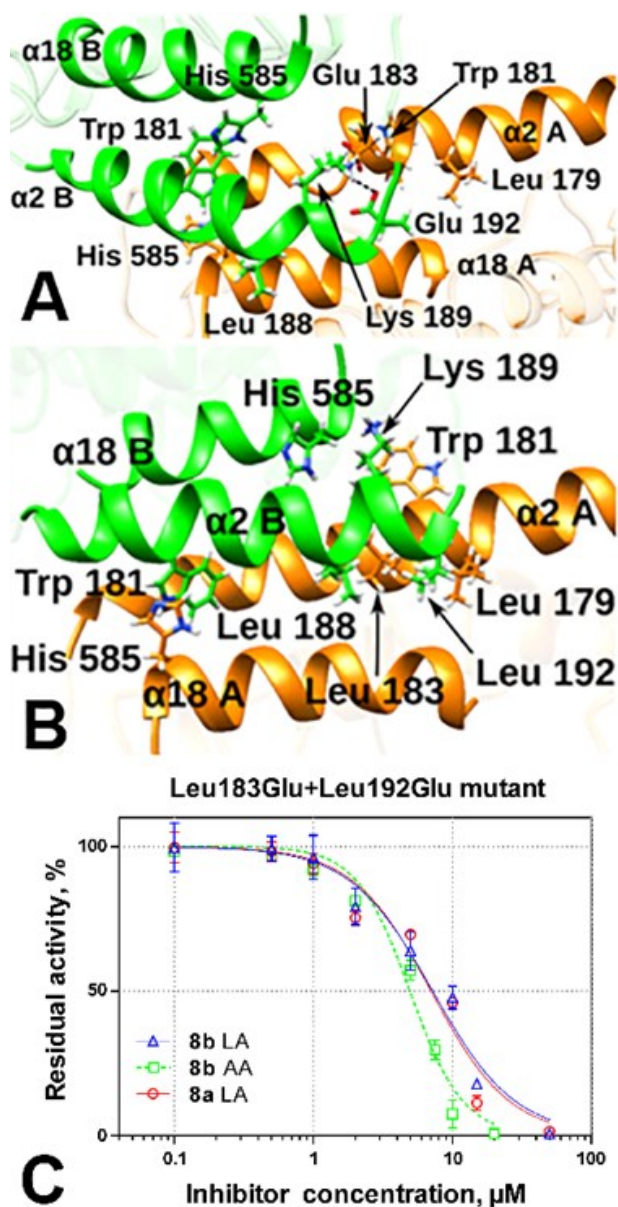


Figura 67. Representación de la interfase del mutante Leu183Glu+Leu192Glu (panel A) frente a la de la enzima *wild-type* (panel B). Inhibición por parte de **8a** y **8b** de la actividad oxigenasa de LA y AA catalizada por el mutante Leu183Glu+Leu192Glu (panel C).

Para explorar si el efecto de la unión de **8b** a uno de los monómeros de 15-LOX puede ser transmitido al otro monómero donde se encontraría unido el LA mediante la interfase que une a ambos, se ha comparado la eficiencia inhibidora de los compuestos **8a** y **8b** en las actividades oxigenasas de LA y AA para la 15-LOX-1 de conejo *wild-type* y su doble mutante Leu183Glu+Leu192Glu. Si en el modo de acción de **8b** están involucrados mecanismos alostéricos, la doble mutación Leu183Glu+Leu192Glu debería inducir un desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis-respuesta de **8b**, acercándola a la que presenta el compuesto **8a**. Cuando se llevó a cabo este experimento, se observó que las curvas dosis-respuesta de la inhibición de LA y AA mediante **8b** eran próximas entre sí (panel C de la Figura 67) con valores de IC₅₀ de $4.95 \pm 0.38 \mu\text{M}$ y $7.02 \pm 0.91 \mu\text{M}$ para AA y LA, respectivamente. De hecho, las curvas dosis-respuesta de **8b**(LA) y **8a**(LA) son prácticamente idénticas. Estos datos sugieren que la integridad estructural de la interfase del dímero de 15-LOX *wild-type* juega un papel crucial en la inhibición específica de sustrato de los ortólogos de 15-LOX por medio de **8b** (Figura 67).

6.4.2.7 Simulaciones de MD de los complejos enzima-inhibidor-sustrato

Para explicar la observación de que el compuesto **8b** produce inhibición enzimática selectiva de sustrato pero **8a** no (Figura 64), se ha planteado como hipótesis que la unión del inhibidor a uno de los monómeros del dímero de 15-LOX puede inducir alteraciones conformacionales en el otro monómero, modificando la alineación del ácido graso en el centro activo. Para comprobar esta hipótesis, primero de todo, se ha explorado si la unión de los inhibidores **8a** y **8b** en el centro activo del monómero regulatorio (monómero A) afecta a la estructura del monómero catalítico (monómero B). Esto se ha llevado a cabo realizando estudios de *docking in silico* de los inhibidores **8a** y **8b** en la cavidad del monómero regulatorio, dejando la correspondiente cavidad del monómero catalítico vacía. La pose energéticamente más favorable de cada inhibidor se ha seleccionado para realizar una simulación de MD. En los paneles A y B de la Figura 68 está representado el centroide del clúster más representativo de la trayectoria de MD correspondiente a los sistemas 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B) y 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B). A diferencia de la pose del *isobutyl (N-(5-(5,6-difluoro-1H-indol-2-yl)-2-methoxyphenyl)sulfamoyl)carbamate*, el esqueleto de anillos de carbono de **8a** y **8b** penetra más profundamente en la cavidad del monómero A, de manera que se establece a lo largo de toda la trayectoria de MD un puente de hidrógeno entre el grupo NH del anillo indol y el grupo OH⁻ del cofactor Fe(III)-OH⁻. Por un lado, para el complejo 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B), también se observó una interacción de los átomos de oxígeno del grupo sulfonamida de **8a** con el grupo NH₂ de la cadena lateral de Gln596, la cual a su vez forma con su grupo carbonilo de la cadena lateral dos puentes de hidrógeno con Arg599 que son estables durante toda la simulación de MD. Parece que, en este complejo, Gln596 hace de puente entre **8a** y Arg599 (panel A de la Figura 68). Arg599 interacciona con la cadena lateral de Ser177 y el esqueleto de Phe175, donde ambos residuos pertenecen a la hélice $\alpha 2$ del monómero A. Finalmente, Arg403 parece encontrarse cerca del grupo carbonilo de **8a**. Por otro lado, para el complejo 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B) se conservan los puentes de hidrógeno entre Gln596 y ambos

átomos de oxígeno del grupo sulfonamida. Además, también se forma un puente de hidrógeno entre Gln596 y el grupo metoxilo de **8b**. Arg599 interactiona también con dicho grupo de **8b** y forma puentes de hidrógeno con Gln596 y Ser177, la cual pertenece a la hélice $\alpha 2$ del monómero A. Arg403 forma un puente de hidrógeno con el grupo

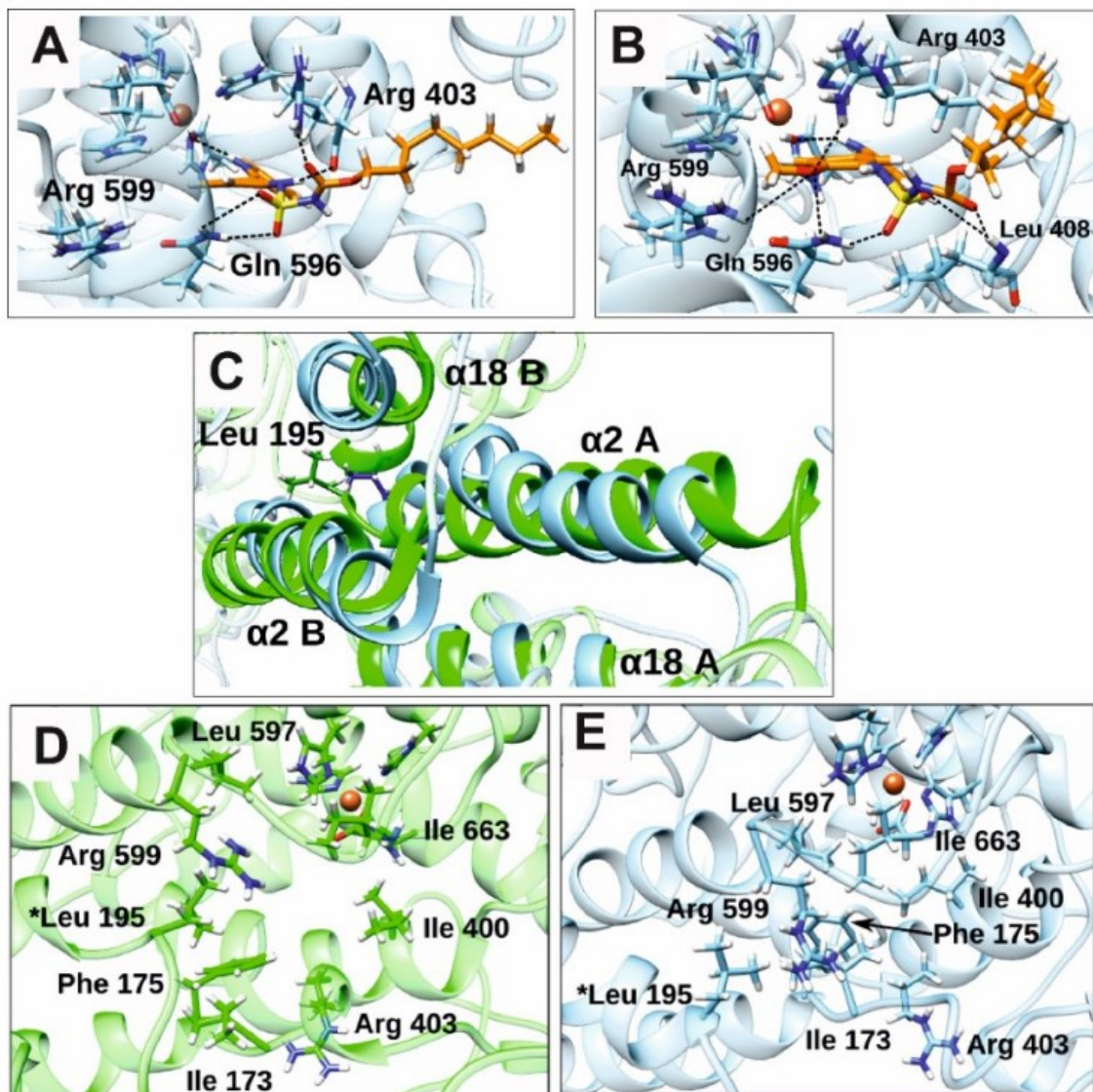


Figura 68. Simulaciones de MD de los complejos enzima-inhibidor. La conformación más representativa de **8a** en el complejo 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B) (panel A) y de **8b** en el complejo 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B) (panel B). Se obtuvieron los modos de unión mediante la generación de clústeres de las estructuras de **8a** y **8b** a lo largo de la simulación de MD con una RMSD de 0.5 Å para los átomos pesados. Los puentes de hidrógeno entre el inhibidor y los residuos de la proteína están indicados por líneas discontinuas negras. Superposición de los complejos 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B) (en verde) y 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B) (en azul) mostrando la región de la interfase (panel C). Entorno de Arg599 y Arg403 del monómero B en los complejos 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B) (panel D) y 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B) (panel E). La posición de Leu195 está marcada con un asterisco para destacar que se encuentra en el extremo final de la hélice $\alpha 2$ del monómero A.

metoxilo de **8b**, aunque no es muy fuerte. Tanto uno de los átomos de oxígeno del grupo sulfonamida como el grupo carbonilo interaccionan con el grupo NH del esqueleto de Leu408. Considerándolo todo, **8b** parece estar más rígidamente enlazado mediante puentes de hidrógeno a la enzima y es su grupo metoxilo el que le confiere más rigidez en comparación con **8a**. Otro resultado relevante obtenido de las simulaciones de MD de los complejos enzima-inhibidor fue la observación que la hélice $\alpha 2$ en el sistema 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B) se reorganizó en comparación con el complejo 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B) (panel C de la Figura 68). Si en el sistema 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B) la hélice $\alpha 2$ permanece cercana a la posición observada en la estructura cristalográfica (*PDB code* 2P0M), en el sistema 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B) adopta una conformación arqueada que es claramente diferente de la conformación del complejo 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B). La posición de las hélices $\alpha 2$ en ambos sistemas se correlaciona con la posición de la hélice $\alpha 18$ del monómero catalítico. La hélice $\alpha 18$ en el sistema 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B) está desplazada cuando se compara con su posición en el complejo 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B). La posición de las hélices $\alpha 2$ en ambos sistemas también se correlaciona con la posición de Leu195 en el extremo de la hélice $\alpha 2$. En el complejo 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B) (panel D de la Figura 68) existe una cavidad vacía alrededor de los residuos Arg403 y Arg599, la cual ofrece una gran cantidad de espacio para anclar el grupo carboxilato del sustrato. En cambio, en el complejo 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B) (panel E de la Figura 68), Ile173 y Phe175 han penetrado en la cavidad para bloquear el acceso a dichas argininas. Posteriormente, se realizaron simulaciones de MD empleando un modelo estructural en el cual los inhibidores **8a** y **8b** se colocaron dentro de la cavidad del conformero A (se recuperó la pose de estos inhibidores del último *snapshot* de la simulación de MD de los sistemas 15-LOX-**8a**(A)-*empty*(B) y 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B)), mientras que por medio de cálculos de *docking* se colocó LA y AA en la cavidad del conformero B (complejos 15-LOX-**8a**(A)-LA(B), 15-LOX-**8a**(A)-AA(B), 15-LOX-**8b**(A)-LA(B) y 15-LOX-**8b**(A)-AA(B)) donde la pose energéticamente más favorable de estos sustratos se seleccionó para iniciar la correspondiente simulación de MD. Cuando LA se encontraba unido en el conformero B en el complejo 15-LOX-**8a**(A)-LA(B), la interacción más estable a lo largo de la simulación de MD entre **8a** y la enzima era un enlace de hidrógeno de la cadena lateral de Arg403 con el grupo carbonilo de **8a**. También era visible otro enlace de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del esqueleto de Arg403 y el grupo NH del grupo anilina sustituido de **8a**. Además, se observó un tercer enlace de hidrógeno estable entre el grupo NH del grupo carbamato de **8a** y el átomo de oxígeno del esqueleto de Gly407. Por otra parte, en el complejo 15-LOX-**8b**(A)-LA(B), el LA está extendido en el centro activo del conformero B (panel A de la Figura 69). Su grupo carboxilato interacciona con la enzima mediante dos puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de Arg403 y Arg599. Ambas interacciones se mantienen durante la totalidad de la simulación de MD. El extremo hidrofóbico de LA se encuentra próximo al fondo de la cavidad que está formado por Ile418, Met419 y Ile593, tal y como sugiere el concepto de triada²⁸. Por otra parte, la presencia del inhibidor **8b** en la cavidad del conformero A modifica la forma del centro activo del conformero B, como pasaba en el complejo 15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B). Ahora, en el complejo 15-LOX-**8b**(A)-LA(B), Arg403 y Arg599, que anclaban el grupo carboxilato del ácido graso, están bloqueadas. Por consiguiente, se altera el modo de

unión de LA y su grupo carboxilato forma nuevos puentes de hidrógeno con Arg405 y Asn152. El extremo hidrofóbico de LA permanece en una posición similar independientemente de si **8a** o **8b** está presente en la cavidad del conformero A. Para una mejor visualización de las diferencias globales entre los complejos 15-LOX-**8a**(A)-LA(B) y 15-LOX-**8b**(A)-LA(B), se muestra la superficie de la cavidad del conformero B para ambos complejos en los paneles C y D de la Figura 69.

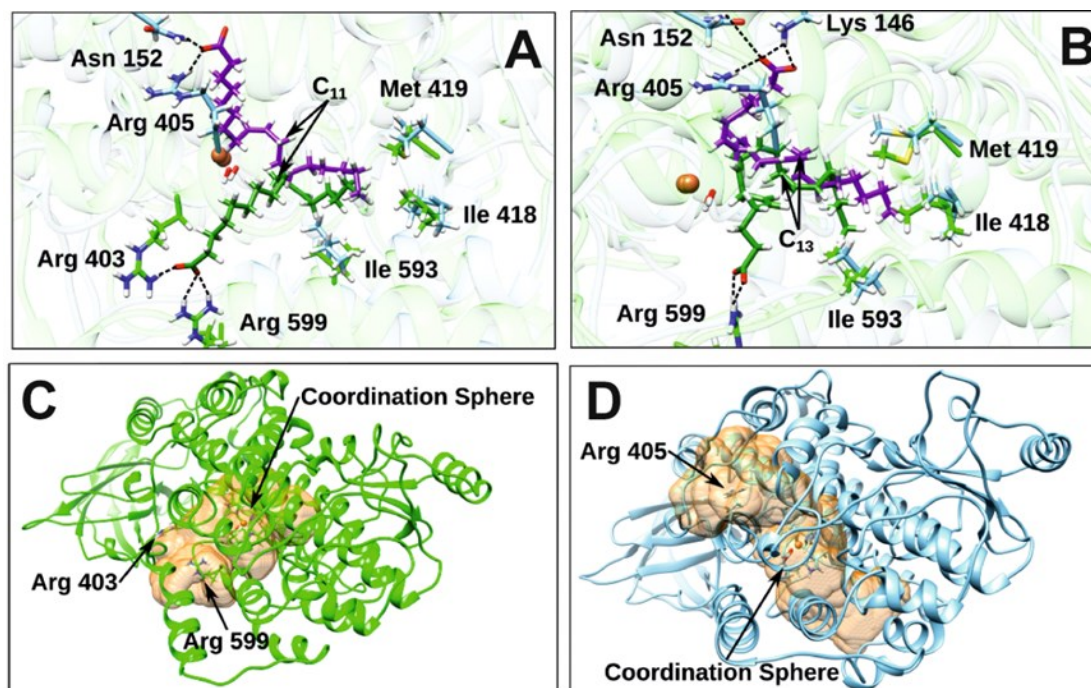


Figura 69. Efecto del inhibidor en la unión del sustrato. El modo de unión más representativo de LA en los complejos 15-LOX-**8a**(A)-LA(B) (en verde) y 15-LOX-**8b**(A)-LA(B) (en lila) (panel A). El modo de unión más representativo de AA en los complejos 15-LOX-**8a**(A)-AA(B) (en verde) y 15-LOX-**8b**(A)-AA(B) (en lila) (panel B). Están representados los centroides del clúster más representativo de LA de los complejos 15-LOX-**8a**(A)-LA(B) y 15-LOX-**8b**(A)-LA(B) y de AA de los complejos 15-LOX-**8a**(A)-AA(B) y 15-LOX-**8b**(A)-AA(B). Se ha realizado el proceso de generación de clústeres utilizando una RMSD de 0.5 Å para los átomos pesados del sustrato. Superficie de la cavidad del monómero B en los complejos 15-LOX-**8a**(A)-LA(B) (panel C) y 15-LOX-**8b**(A)-LA(B) (panel D).

De manera interesante, se observó que **8a** a lo largo de la simulación de MD del complejo 15-LOX-**8a**(A)-AA(B) adopta una conformación diferente a la que adoptaba en la simulación de MD del complejo 15-LOX-**8a**(A)-LA(B). Por lo tanto, el inhibidor **8a** puede encontrarse en el conformero A en dos poses diferentes, dependiendo de la naturaleza del sustrato que se encuentra en el centro activo del conformero B. Dado que **8b** presenta el mismo modo de unión en los tres complejos estudiados (15-LOX-**8b**(A)-*empty*(B), 15-LOX-**8b**(A)-LA(B) y 15-LOX-**8b**(A)-AA(B)), parece que la estructura del complejo enzima-inhibidor es más rígida cuando **8b** se encuentra unido al centro activo del conformero A. Cabe destacar que se alcanzó la misma conclusión analizando los puentes de hidrógeno que establecían **8b** y **8a** con la enzima cuando el conformero B se

encontraba vacío. Siguiendo con el complejo 15-LOX-**8a**(A)-AA(B), el grupo carboxilato del AA interactúa con Arg599 mediante dos puentes de hidrógeno (panel B de la Figura 69), los cuales se mantienen a lo largo de toda la simulación de MD. El extremo hidrofóbico del AA se mueve a lo largo de la trayectoria pero permanece en el fondo de la cavidad rodeado por los residuos Ile418, Met419 y Ile593, como sugiere el concepto de triada²⁸. En cambio, en el complejo 15-LOX-**8b**(A)-AA(B), la presencia del inhibidor **8b** en el conformero A modifica la forma de la cavidad del conformero B bloqueando el acceso a Arg403 y Arg599. Aunque el modo de unión de AA cambia en relación con su grupo carboxilato (se forman nuevos puentes de hidrógeno entre éste y Arg405, Asn152 y Lys146), su extremo hidrofóbico permanece en la misma zona observada para el complejo 15-LOX-**8a**(A)-AA(B).

Por otra parte, en los complejos 15-LOX-**8a**(A)-LA(B) y 15-LOX-**8b**(A)-LA(B), el LA adopta diferentes conformaciones, cosa que se ve reflejada en el número de estructuras bien orientadas (aquellas con el enlace C₁₁-H_{11proX} bien orientado para la abstracción de hidrógeno) en ambos sistemas (Tabla 20). Cuando **8b** está presente en el sistema, se puede apreciar una clara reducción en el número de estructuras donde el LA se encuentra bien orientado en comparación con el número de estructuras bien orientadas obtenidas para el sistema **8a**. En la simulación de MD del sistema 15-LOX-**8a**(A)-LA(B), se ha encontrado que un 79% del número total de *snapshots* seleccionados corresponde a estructuras bien orientadas para la abstracción de hidrógeno del C₁₁, mientras que en el caso del sistema 15-LOX-**8b**(A)-LA(B) únicamente hay un 34% (Tabla 20 y paneles A y B de la Figura 70). Estos datos indican que el LA está enlazado a 15-LOX en una conformación menos reactiva en relación con la orientación de los átomos de hidrógeno unidos a C₁₁. Para el AA, la situación es algo diferente, ya que el número de estructuras bien orientadas (aquellas con el enlace C₁₃-H_{13proX} bien orientado para la abstracción de hidrógeno) para los complejos 15-LOX-**8a**(A)-AA-(B) (88.5%) y 15-LOX-**8b**(A)-AA-(B) (88%) es similar (Tabla 21 y paneles C y D de la Figura 70).

Tabla 20. Distancias promedio del C₁₁ y sus átomos de hidrógeno del LA respecto del átomo de oxígeno del grupo OH⁻ del cofactor Fe(III)-OH⁻ para los sistemas sin inhibidor, con **8a** y con **8b** junto con el porcentaje de estructuras bien orientadas para la abstracción de hidrógeno.

Sistema	d(C ₁₁ -OH) (Å)	d(H _{11proS} -OH) (Å)	d(H _{11proR} -OH) (Å)	Estructuras con al menos un H bien orientado (%)
sin inhibidor ^a	4.6	4.7	4.6	90.09
8a ^b	5.6	5.8	5.6	78.89
8b	5.5	6.2	5.6	34.00

^aEstos resultados corresponden a la simulación de MD del complejo 15-LOX-*empty*(A)-LA(B).

^bEn el sistema 15-LOX-**8a**(A)-LA(B), los promedios se calcularon para el segundo período de 100 ns de la trayectoria de MD.

Tabla 21. Distancias promedio del C₁₃ y sus átomos de hidrógeno del AA respecto del átomo de oxígeno del grupo OH⁻ del cofactor Fe(III)-OH⁻ para los sistemas sin inhibidor, con **8a** y con **8b** junto con el porcentaje de estructuras bien orientadas para la abstracción de hidrógeno.

Sistema	d(C ₁₃ -OH) (Å)	d(H _{13proS} -OH) (Å)	d(H _{13proR} -OH) (Å)	Estructuras con al menos un H bien orientado (%)
sin inhibidor ^a	5.2	4.8	5.5	97.78
8a	5.4	4.9	6.0	88.47
8b	6.4	6.0	7.0	87.90

^aEstos resultados corresponden a la simulación de MD del complejo 15-LOX-*empty*(A)-AA(B).

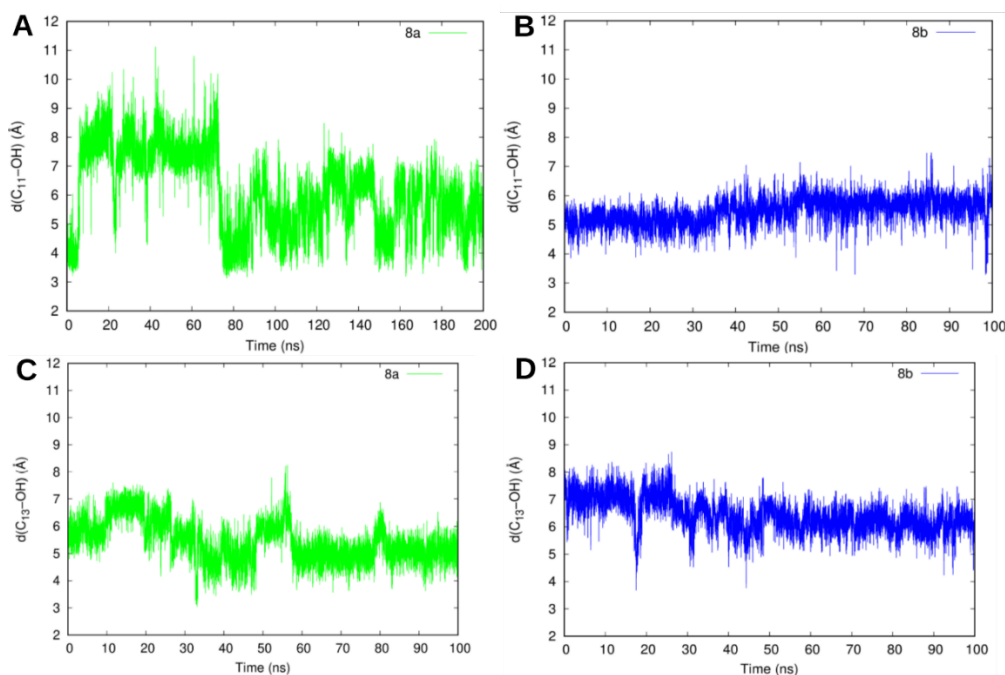


Figura 70. Distancia C₁₁-OH en función del tiempo para los complejos 15-LOX-**8a**(A)-LA(B) (panel A) y 15-LOX-**8b**(A)-LA(B) (panel B). Distancia C₁₃-OH en función del tiempo para los complejos 15-LOX-**8a**(A)-AA(B) (panel C) y 15-LOX-**8b**(A)-AA(B) (panel D). Cabe destacar que para el complejo 15-LOX-**8a**(A)-LA(B) se necesitaron 100 ns adicionales para conseguir una correcta equilibración del sistema. Se seleccionó un *frame* cada 10 ps.

6.4.3 Conclusiones

En esta tesis se ha descrito la caracterización funcional de nuevos inhibidores específicos de sustrato de 15-LOX. Más concretamente, éstos inhiben selectivamente la actividad oxigenasa del LA para la 15-LOX-1 de conejo y humana con valores de IC₅₀ en el rango

nanomolar, afectando ligeramente la velocidad de oxigenación del AA. Por otra parte, se ha sugerido que estos compuestos ejercen su actividad inhibidora mediante un mecanismo alostérico, ya que como 15-LOX-1 muestra afinidades de unión comparables para LA y AA^{356,368}, un modo de inhibición convencional predeciría que la oxigenación de ambos sustratos debería ser inhibida en una extensión similar a una concentración de inhibidor dada. Este mecanismo de acción alostérico se basa en nuestras observaciones previas de que 15-LOX puede formar dímeros transitorios en solución acuosa, de manera que la unión del inhibidor en la cavidad de uno de los monómeros podría inducir cambios conformacionales en el centro catalítico del otro monómero. Por otra parte, el grupo 2-metoxianilina unido al núcleo del farmacóforo parece ser crucial para la inhibición selectiva de sustrato de 15-LOX.

Capítulo 7

Diseño racional de inhibidores específicos de la COX-2 que incorporen un fotointerruptor tipo azobenceno

7.1 Introducción

Como se comentó en la sección 1.3.5.4, la familia de inhibidores selectivos de la COX-2 (COXIBs) es ideal para introducir un fotointerruptor tipo azobenceno (AB), ya que la gran mayoría de estos inhibidores son compuestos diarilheterociclos (contienen tres anillos donde al menos dos son de benceno). Debido a su gran potencia antiinflamatoria y otras propiedades interesantes desde un punto de vista farmacológico (como su utilidad para tratar ciertos tipos de cáncer), se ha escogido el celecoxib (ver Figura 72) como compuesto de partida para introducir dicho fotointerruptor. Es importante recordar que el objetivo detrás de la introducción de un fotointerruptor es la supresión de los efectos secundarios del fármaco original, manteniendo su eficacia (ver sección 1.3.5.4).

El primer paso sería estudiar el modo de unión del celecoxib en el centro activo COX de la COX-2 (aunque se disponen de diferentes estructuras cristalográficas de éste con la COX-2, ver sección 1.3.5.2, es interesante comprobar mediante simulaciones de MD si su modo de unión en estas estructuras se conserva cuando la enzima se encuentra en solución acuosa) para determinar en qué posiciones del fármaco se puede introducir un grupo azo en conformación *cis*(*Z*) alterando lo mínimo posible la forma de la superficie de contorno de dicho fármaco (ver Figura 72). Cabe destacar que las posiciones de introducción del grupo azo obtenidas para el celecoxib se pueden transferir en gran medida a los COXIBs que son diarilheterociclos, ya que estos presentan una estructura química (esqueleto de tres anillos) y una forma de la superficie de contorno muy similares a las del celecoxib. De hecho, un fármaco para el cual sería especialmente interesante poder transferir estas

zonas de introducción del grupo azo debido a sus enormes propiedades antiinflamatorias es el rofecoxib (ver Figura 72), ya que por culpa de sus efectos secundarios severos ligados a su gran selectividad respecto a la COX-2 ha tenido que ser retirado del mercado por completo a pesar de ser uno de los antiinflamatorios más potente de esta familia de compuestos.

Una vez determinadas dichas posiciones, ya se está en condiciones de proponer compuestos derivados que contengan el grupo azo y conserven la forma de la superficie de contorno lo máximo posible del fármaco original cuando el grupo azo se encuentra en su conformación *cis*(*Z*). Una vez diseñados, es de vital importancia comprobar que el conformero *trans*(*E*) de estos compuestos no inhibe a la COX-2, mientras que su conformero *cis*(*Z*) sí, ya que en caso contrario la introducción del grupo azo no surtiría el efecto deseado. La forma más directa de realizar dicha comprobación es determinando para un compuesto derivado dado que el conformero *trans*(*E*) no cabe en el centro activo COX de la COX-2, mientras que el conformero *cis*(*Z*) adopta una conformación similar al fármaco de partida.

Es importante notar que debido a que el centro activo COX de la COX-1 tiene unas dimensiones menores que el de la COX-2 (ver sección 1.3.1), en principio, es muy probable que los compuestos derivados que incorporan el grupo azo no sean inhibidores de la COX-1, ya que este grupo azo los hace ligeramente más voluminosos que el fármaco original. Sin embargo, podría ser que estos compuestos derivados adoptaran una conformación que pudiera aprovechar algún espacio del centro activo COX de la COX-1 que el fármaco original no ocupa. Por todo esto, una vez determinada la inhibición del conformero *cis*(*Z*) del compuesto derivado respecto a la COX-2, sería interesante comprobar si pueden también inhibir la COX-1, cosa que se realizará en trabajos posteriores a la presente tesis. Por otra parte, si para un compuesto derivado dado ya se ha comprobado que su conformero *trans*(*E*) no se puede alojar dentro del centro activo COX de la COX-2, es muy poco probable que dicho conformero pueda caber dentro del centro activo COX de la COX-1 por las cuestiones de espacio que se han comentado en este mismo parágrafo. Para terminar, cabe destacar que se está realizando una colaboración con dos grupos experimentales con el objetivo de probar la potencia inhibidora de estos compuestos derivados respecto a la COX-2, donde uno de estos grupos experimentales se encarga de sintetizar dichos compuestos derivados y hacer pruebas de irradiación de los mismos (grupo del Dr. Jordi Hernando, Dr. Ramón Alibés y Dr. Félix Busqué del departamento de química de la UAB) mientras que el otro se encarga de realizar los experimentos necesarios para determinar la capacidad inhibidora respecto de la COX-2 de los dos conformeros de dichos compuestos (grupo del Dr. Pau Gorostiza de l'Institut de bioenginyeria de Catalunya).

7.2 Metodología

En relación con la enzima, la COX-2 se ha modelizado a partir de la estructura cristalográfica del homodímero de la COX-2 humana (h-COX-2; *PDB code*: 5F1A)³⁶⁹. Dicha estructura se ha procesado de manera que se ha eliminado su monómero B, los diferentes agentes cristalizantes que se encuentran unidos al monómero A y las aguas

crystalográficas que contiene dicho monómero A. Además, se ha asignado el estado de protonación a la estructura resultante mediante el servidor web H++^{246,247} donde se ha empleado un pH de 7.5 para los residuos titulables. Sin embargo, el estado de protonación correspondiente al grupo hemo y a la His388 (residuo al cual se encuentra coordinado el grupo hemo) se ha asignado manualmente para asegurar una correcta descripción de éstos. Por otra parte, el grupo hemo se encontraba complejado a un Co³⁺, el cual fue sustituido por un Fe³⁺, que es el ion que realmente se encuentra complejado a dicho grupo. Finalmente, Tyr385 (residuo responsable de realizar la abstracción de hidrógeno de los diferentes sustratos de la COX-2) se ha modelado como radical para dejar el centro activo COX lo más libre posible.

En relación con los estudios de *docking*, éstos se realizaron con el programa GOLD²⁴⁸. Respecto a los diferentes compuestos derivados que incorporan el grupo azo (ver Figuras 74 y 76) y al rofecoxib (ver Figura 72), estos cálculos se restringieron al centro activo COX del monómero A de la h-COX-2 resultante del procedimiento anterior. Durante la exploración conformacional se ha considerado a la enzima como un receptor rígido, mientras que el ligando disponía de flexibilidad completa. Por otra parte, se empleó el algoritmo genético (GA) para realizar la exploración conformacional de los diferentes inhibidores y el lugar de unión de éstos se definió como una esfera de 20 Å de radio centrada en el C ζ de la Arg513 (residuo que se encuentra en el *sidepocket* y que es característico de la COX-2). En los casos donde el conformero *trans(E)* de los compuestos derivados adoptaba una conformación muy extendida, se repitió el cálculo de *docking* empleando un radio de 26 Å para la esfera anterior con el objetivo de asegurar que dicho conformero no se podía alojar en el interior del centro activo COX de la h-COX-2. Se hizo una estimación de las energías de Gibbs de unión mediante la función de *fitness* ChemScore.

En relación con las simulaciones de MD, los diferentes sistemas se montaron utilizando el procedimiento recomendado por el paquete de programas AMBER²⁴⁹. Para los átomos de proteína se utilizó el *force field* ff14SB²⁵⁰. Los parámetros de *force field* para el grupo hemo, la Tyr385 y la His388 se recuperaron de trabajos previos^{12,13,370}, mientras que para este estudio se desarrollaron parámetros específicos para el celecoxib, el rofecoxib y los diferentes compuestos derivados que contenían el grupo azo. Los cálculos para generar dichos parámetros específicos se realizaron siguiendo el protocolo estándar de AMBER con los módulos Antechamber y Parmchk2, aunque como todos estos compuestos difieren sustancialmente de los sustratos comunes empleados en AMBER, se tuvo que emplear un procedimiento desarrollado por MacKerell *et al.*³⁶⁴ para subsanar los problemas que presentaban algunos parámetros de los ángulos diedros de dichos compuestos. Además, el *force field* de AMBER no describe correctamente el grupo azo, permitiendo que la isomerización *cis(Z)-trans(E)* tenga lugar con demasiada facilidad, cosa que se subsanó empleando los parámetros desarrollados para dicho grupo a nivel QM por Duchstein *et al.*³⁷¹. Se usó la librería GAFF2^{249,251} como fuente para el resto de parámetros de los ligandos. Para optimizar las estructuras del celecoxib, el rofecoxib y los diferentes compuestos derivados que contenían el grupo azo se empleó el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) y sus cargas atómicas se asignaron utilizando el procedimiento RESP de Merz y Kollman²⁵². Además, los estados de protonación para todos los ligandos se establecieron

a mano para asegurar que éstos coincidan con el estado de protonación que se encontraría en condiciones fisiológicas.

Todas las simulaciones de MD siguieron el mismo protocolo, las únicas diferencias fueron la longitud del período de producción y las estructuras de partida. Después de combinar los archivos de enzima y sustrato, los diferentes complejos enzima-sustrato se solvataron con una caja ortorrómbica de aguas preequilibradas TIP3P²⁵⁵ y su carga total se neutralizó añadiendo aniones cloruro mediante el programa tLeap. Los sistemas resultantes contenían alrededor de 70000 átomos, de los cuales unos 9000 pertenecían al complejo enzima-ligando. Los átomos restantes representan moléculas de agua y aniones cloruro. Todas las simulaciones de MD se calcularon con la versión AMBER 18 GPU (CUDA) del paquete de programas PMEMD^{214,256}. En primer lugar, el sistema se sometió a 22000 pasos de minimización de energía utilizando el método *steepest-descent* para evitar malos contactos. En los primeros 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos de proteína y sustrato con una constante de fuerza de $5.0 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$, de manera que sólo se relajaron el solvente y los iones. En los siguientes 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos del esqueleto proteico y a los átomos pesados del sustrato con una constante de fuerza de $5.0 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. En los últimos 10000 pasos, todo el sistema se mantuvo libre de restricciones. Después de esto, se realizaron simulaciones de MD usando PBC. El sistema se calentó gradualmente de 0 K a 300 K durante un período de 200 ps. A continuación, se ha calculado una simulación de MD de 1 ns a temperatura y presión constantes (300 K, 1 bar) para ajustar el volumen de la caja ortorrómbica de manera que la densidad del sistema alcanzara un valor próximo a 1 g cm^{-3} . A lo largo del calentamiento y la etapa isobárica, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos del esqueleto proteico y a los átomos pesados del sustrato con una constante de fuerza de $5.0 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$, mientras que no se aplicó restricción alguna al resto del sistema. La temperatura se controló por medio de dinámica de Langevin²¹⁶, mientras que la presión se ajustó mediante el baróstato de Berendsen²¹⁷. Después, se realizó una etapa de equilibración de 10 ns a temperatura (300 K) y volumen constantes. En último lugar, se calculó un período de producción dentro del mismo colectivo isotérmico-isocórico. A lo largo de toda la trayectoria de MD se empleó un *time step* de 2 fs. Todos los enlaces y ángulos que contenía átomos de hidrógeno se restringieron mediante el algoritmo SHAKE²¹⁵. Las interacciones no enlazantes se calcularon empleando un *cutoff* de 9 Å. Debido a que todos los cálculos de *docking* para el celecoxib fueron infructuosos (ninguno de éstos colocaba al celecoxib dentro del centro activo COX), éste se colocó de manera manual en el centro activo COX del monómero A de la h-COX-2 resultante del procedimiento descrito más arriba imitando la pose observada para éste en la estructura cristalográfica de COX-2 de ratón (*PDB code* 3LN1)³⁷² y en uno de los artículos teóricos de Åqvist *et al.*¹⁹. Para relajar el sistema que contiene el celecoxib colocado de manera manual en el monómero A de la h-COX-2 bastó el cálculo de un período de producción de 100 ns. Por otra parte, la mejor pose de *docking* del rofecoxib y de los diferentes compuestos derivados clasificados como candidatos prometedores de mayor potencial (ver sección 7.3.4) en el monómero A de la h-COX-2 relajado (que resulta de eliminar el celecoxib en la última estructura de la simulación de MD del complejo h-COX-2-celecoxib anterior) se utilizó como estructura de partida para las simulaciones de MD de los complejos entre COX-2 y dichos compuestos. Para permitir

la relajación y la adaptación del sistema a la presencia del compuesto introducido, se calculó una simulación de MD con un período de producción de 100 ns para el confórmero *cis(Z)* de estos compuestos derivados, mientras que para el rofecoxib dicho período fue de 200 ns. En cambio, para los confórmeros *trans(E)* de estos compuestos derivados se alargó la longitud del período de producción hasta determinar que la capacidad inhibidora de éstos respecto a la h-COX-2 era despreciable. Los análisis de las simulaciones de MD se llevaron a cabo con AmberTools18, mientras que la visualización de estas trayectorias se realizó con los programas VMD²⁷⁶ y USCF CHIMERA²⁷⁷.

7.3 Resultados

7.3.1 Simulación de MD para el complejo h-COX-2-celecoxib

Con el objetivo de comprobar si la pose establecida de manera manual para el celecoxib dentro del centro activo COX de la h-COX-2 era estable, se ha calculado una simulación de 100 ns para el complejo h-COX-2-celecoxib donde el celecoxib presentaba la pose en cuestión. Visualizando la simulación de MD, se ha podido apreciar que la pose del celecoxib apenas ha variado a lo largo de ésta, confirmando así que dicha pose era estable. Por otra parte, los rasgos más característicos de la pose que adopta el celecoxib dentro del centro activo COX de la h-COX-2 (ver Figura 71) son los siguientes: 1) su grupo sulfonamida se encuentra en el *sidepocket* (ver Figura 11 de la sección 1.3.1) formando dos fuertes puentes de hidrógeno con el grupo cetona de la cadena lateral de Gln192 y con el átomo de oxígeno del esqueleto de Leu352. Estas dos interacciones parecen ser las que mantienen sujeto el grupo sulfonamida dentro del *sidepocket*. Además, Arg513 forma un puente de hidrógeno más débil que los anteriores con uno de los átomos de oxígeno de dicho grupo sulfonamida y His90 interacciona electrostáticamente de manera favorable con este mismo átomo de oxígeno de este grupo; 2) Arg120, que se encuentra en la entrada del centro activo COX, interacciona electrostáticamente de manera favorable con el heterociclo y el grupo CF₃ del celecoxib. Durante una parte de la simulación de MD, el heterociclo y la cadena lateral de Arg120 están orientados paralelamente entre sí; 3) el grupo tolueno del celecoxib se encuentra en el canal principal del centro activo COX, cosa que hace que sea muy difícil ocupar el recoveco hidrofóbico de dicho centro activo por un sustrato. Es bastante claro que en esta pose (ver Figura 71), el celecoxib dentro del centro activo COX de la h-COX-2 ejerce un efecto inhibitor, ya que evita la unión de cualquier sustrato a este centro activo.

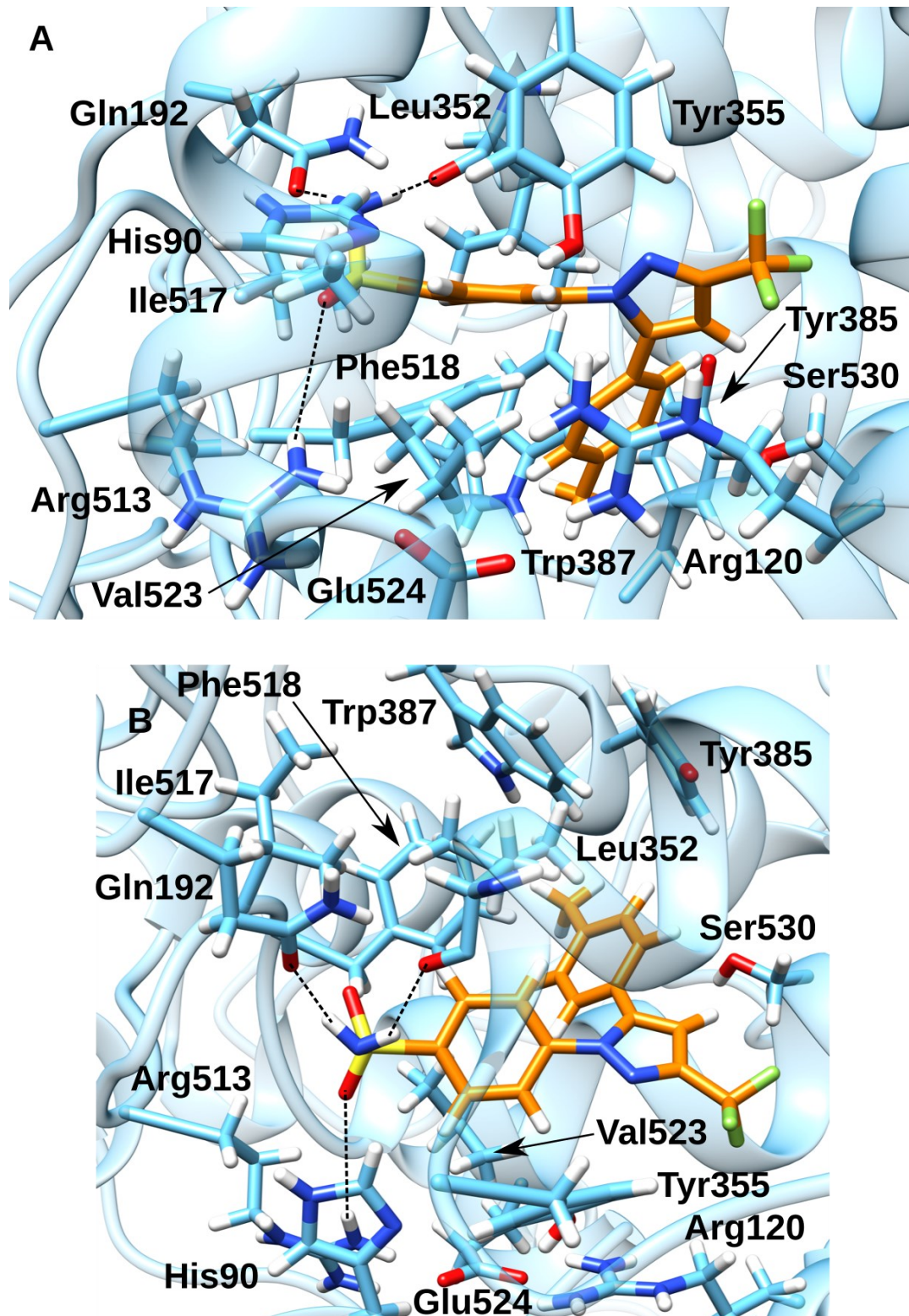


Figura 71. Representación desde una perspectiva frontal (panel A) y vertical (panel B) del modo de unión del celecoxib dentro del centro activo COX de la h-COX-2. Se han indicado los residuos más característicos del centro activo COX, los residuos que interaccionan de manera más intensa con el celecoxib y los residuos más destacados que se encuentran entre el anillo de benceno que contiene el grupo sulfonamida y el grupo tolueno del celecoxib para hacer notar que en esta región de la enzima hay poco espacio libre disponible. Los puentes de hidrógeno se han indicado con líneas negras discontinuas.

Respecto a la introducción de un grupo azo, parecería claro que la posición más favorable para introducir dicho grupo es entre el grupo tolueno y el heterociclo del celecoxib (ver Figura 71). Además, la zona que se encuentra entre el anillo de benceno que contiene el grupo sulfonamida y el heterociclo también parece ser una posición bastante favorable, aunque hay menos espacio que en caso anterior y podría ser que se estableciera alguna interacción desfavorable entre los residuos que conforman la entrada y el grupo azo a introducir (ver Figura 71). Finalmente, la posición entre el anillo de benceno que contiene el grupo sulfonamida y el grupo tolueno sería la más desfavorable de todas, ya que la introducción de un grupo azo en esa posición lo colocaría en una región de la enzima que se encuentra bastante poblada por cadenas laterales de los residuos de ésta, de manera que sería bastante probable que se produjesen malos contactos entre la enzima y el compuesto derivado. Además, la introducción de este grupo en dicha posición distorsionaría enormemente la forma de la superficie de contorno del conformero *cis(Z)* del compuesto derivado resultante respecto de la del celecoxib original. Considerándolo todo, la introducción del grupo azo en sustitución del enlace C-C que une el heterociclo con el grupo tolueno (ver Figura 72) debería ser la más favorable de todas, ya que la forma de la superficie de contorno sería practicante la misma para el celecoxib y el conformero *cis(Z)* del compuesto derivado. Además, el grupo azo quedaría en una región de la enzima donde no debería interactuar con ningún residuo de ésta de manera intensa. Antes de presentar los resultados obtenidos para este primer compuesto derivado del celecoxib, al que vamos a denominar candidato 0, se van a mostrar los resultados correspondientes al rofecoxib para determinar si su modo de unión es similar al del celecoxib. En caso de ser así, se podrían extrapolar a éste las conclusiones sobre la introducción de un grupo azo obtenidas para el celecoxib y, además, se podría utilizar también como esqueleto para diseñar nuevos compuestos que contuvieran un fotointerruptor tipo AB.

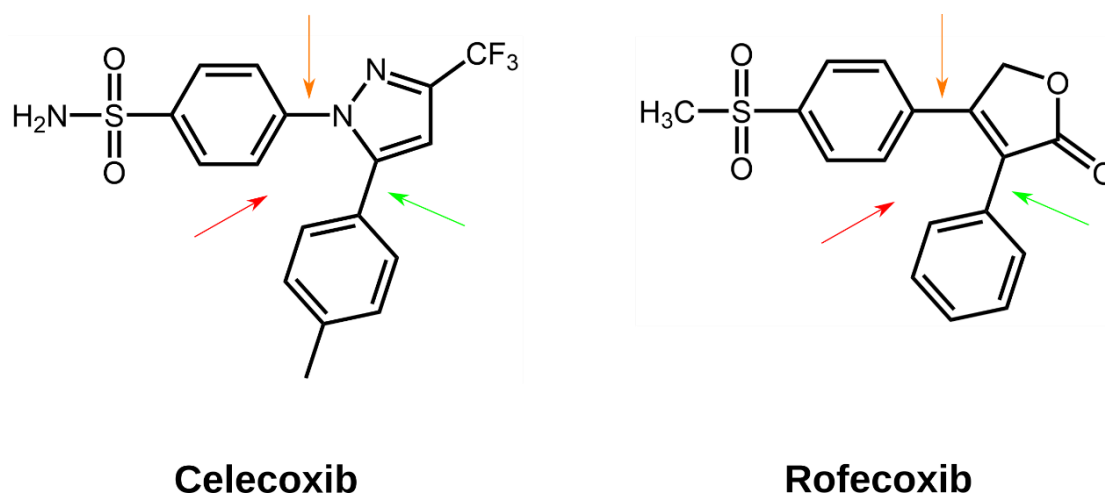


Figura 72. Estructura química de celecoxib y rofecoxib donde se ha indicado con flechas las diferentes posiciones donde se puede introducir el grupo azo generando el fotointerruptor correspondiente. El color de estas flechas indica la bondad de la posición del compuesto respecto a la introducción del grupo azo según nuestras simulaciones de MD para estos dos compuestos, donde el verde indica la mejor posición, el naranja la posición intermedia y el rojo la peor posición.

7.3.2 Cálculos de *docking* y simulación de MD del complejo h-COX-2-rofecoxib

Para cerciorarse de que el rofecoxib realmente se une al centro COX de la h-COX-2 de manera similar a cómo lo hace el celecoxib, se calculó en este caso particular una simulación de MD de 200 ns, ligeramente más larga que las calculadas para el conformero *cis(Z)* de los compuestos derivados, para el complejo h-COX-2-rofecoxib. Es necesario destacar que la mejor pose de *docking*, que es con la que se inició la simulación de MD, y el modo de unión que se observa a lo largo de la simulación de MD para el rofecoxib son muy parecidos entre sí. Por lo tanto, lo que se va a exponer a continuación se puede aplicar en gran medida a esta mejor solución de *docking* para el rofecoxib. Los rasgos más característicos del modo de unión que adopta el rofecoxib dentro del centro activo COX de la h-COX-2 a lo largo de la simulación de MD del complejo h-COX-2-rofecoxib son los siguientes (ver Figura 73): 1) su grupo metanosulfonilo se encuentra dentro del *sidepocket* formando dos puentes de hidrógeno, uno entre un átomo de oxígeno de dicho grupo y el grupo NH del esqueleto de Phe518 y el otro, entre el otro átomo de oxígeno de este grupo y uno de los grupos NH₂ de Arg513, siendo este último puente de hidrógeno el más fuerte de los dos. Además, His90 interacciona electrostáticamente de manera favorable con el mismo átomo de oxígeno que forma el puente de hidrógeno con Arg513; 2) el heterociclo del rofecoxib forma dos puentes de hidrógeno más débiles que los anteriores con su grupo cetona, uno con el grupo NH del esqueleto de Leu531 y el otro con el grupo OH de la cadena lateral de Ser530; 3) el anillo de benceno que está unido al heterociclo y que no está sustituido se encuentra a lo largo del canal principal del centro activo COX, cosa que, como se ha expuesto para el caso del celecoxib, dificulta la ocupación del recoveco hidrofóbico del centro activo COX por parte de un sustrato cualquiera.

Teniendo todo esto en cuenta, es claro que el rofecoxib también presenta un efecto inhibitor respecto a la h-COX-2 donde Arg513 podría desempeñar un papel crucial en la mayor selectividad del rofecoxib en relación con dicha enzima en comparación con el celecoxib, ya que la interacción con este residuo, la cual no puede darse en la COX-1, es la más intensa de las que presenta y además es la principal responsable de que el grupo metanosulfonilo se mantenga unido al *sidepocket*. Por otra parte, debido a que el modo de unión de rofecoxib y celecoxib son muy similares entre sí, se pueden extrapolar al rofecoxib las conclusiones sobre la introducción de un grupo azo obtenidas para el celecoxib y es viable utilizar el esqueleto del rofecoxib para diseñar nuevos compuestos que contengan un fotointerruptor tipo AB.

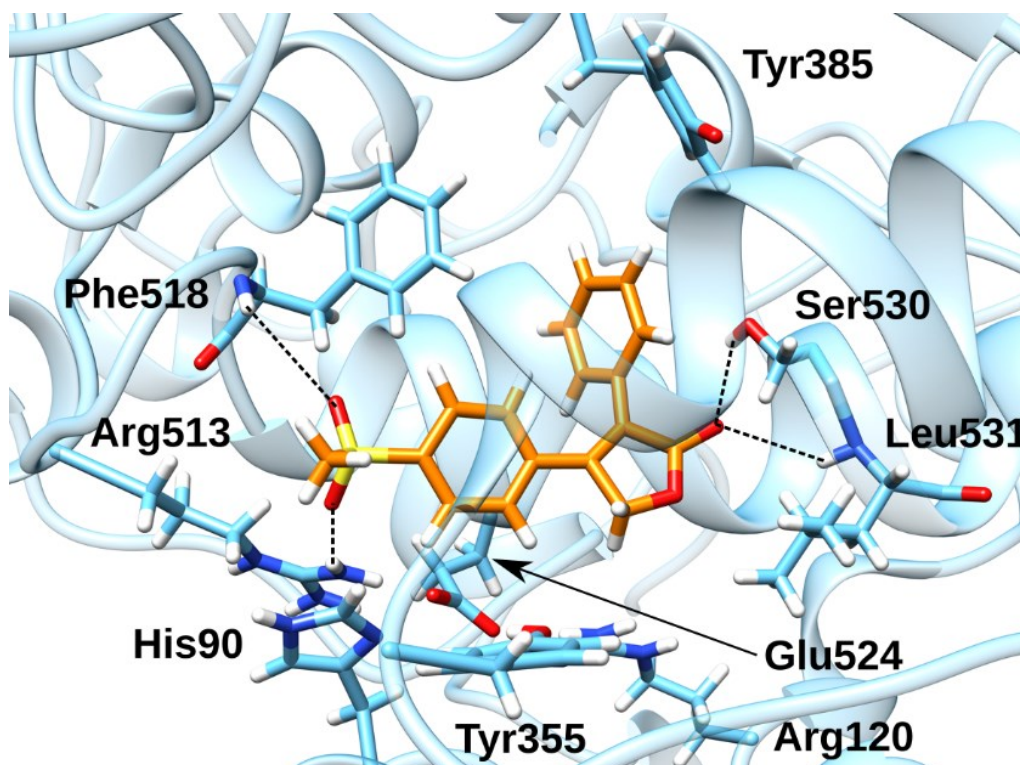


Figura 73. Representación desde una perspectiva vertical del modo de unión del rofecoxib en el interior del centro activo COX de la h-COX-2. Se han indicado los residuos más característicos del centro activo COX y los residuos que interaccionan de manera más intensa con el rofecoxib. Los puentes de hidrógeno se han indicado con líneas negras discontinuas.

7.3.3 Cálculos de *docking* y simulaciones de MD para el candidato 0 del celecoxib

En relación con los cálculos de *docking* para el candidato 0 (Figura 74), la mejor pose de éste para su conformero *cis(Z)* coloca el grupo sulfonamida en el interior del *sidepocket*, el heterociclo ocupando la entrada y el grupo tolueno dificultando el acceso al recoveco hidrofóbico, pero no ocupando el canal principal sino la parte superior del espacio existente entre Tyr385 y Ser530. En cambio, la mejor pose de los cálculos de *docking* para el conformero *trans(E)* coloca a dicho conformero de manera casi idéntica al modo de unión del celecoxib dentro del centro activo COX de la h-COX-2, es decir, el grupo sulfonamida se encuentra en el interior del *sidepocket*, el heterociclo ocupa la entrada y el grupo tolueno se encuentra a lo largo del canal principal del centro activo COX dificultando la ocupación del recoveco hidrofóbico. La principal diferencia respecto del modo de unión del celecoxib es que en el presente caso la situación del grupo tolueno en el canal principal es más profunda. Por lo tanto, según los cálculos de *docking*, ambos conformeros inhibirían a la COX-2 y *a priori* no se podría decir cuál de los dos tendría una potencia inhibitoria mayor respecto a esta enzima. De hecho, si se tuviera que escoger un conformero como el más potente, con los resultados que se han expuesto hasta ahora, lo más prudente sería escoger el conformero *trans(E)*, ya que presenta una conformación muy similar a la del celecoxib, la cual se sabe que realmente inhibe.

Candidato 0

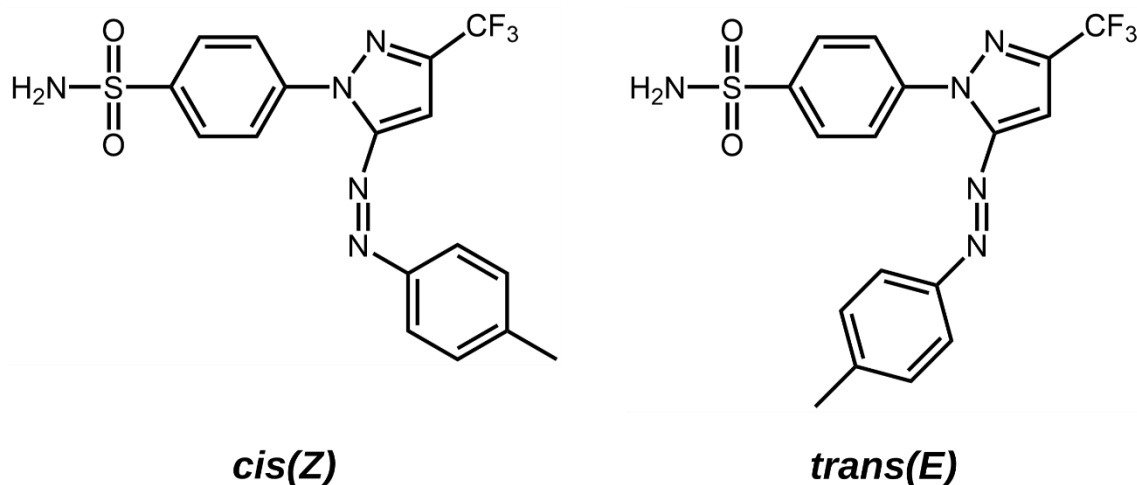


Figura 74. Representación de los conformeros *cis(Z)* y *trans(E)* del candidato 0 del celecoxib. Es necesario subrayar que en la posición donde se ha introducido el grupo azo, se ha eliminado el enlace simple que unía a los dos anillos en el compuesto original.

En relación con las simulaciones de MD para el candidato 0, cabe destacar que el modo de unión proveniente del *docking* con el cual se ha iniciado la simulación de MD apenas se ve alterado a medida que avanza la simulación de MD para ambos conformeros de dicho candidato. Respecto al modo de unión del conformero *cis(Z)* (panel A de la Figura 75), el grupo sulfonamida se encuentra en el interior del *sidepocket* anclado por tres puentes de hidrógeno: 1) entre el grupo NH₂ de la sulfonamida y el grupo cetona de la cadena lateral de Gln192; 2) entre el grupo NH₂ de la sulfonamida y el átomo de oxígeno del esqueleto de Leu352; 3) entre un átomo de oxígeno del grupo sulfonamida y el grupo NH del esqueleto de Phe518. Además, His90 interactúa electrostáticamente de manera favorable con uno de los átomos de oxígeno del grupo sulfonamida. El grupo CF₃ interactúa electrostáticamente de manera favorable con la cadena lateral de Arg120, mientras que el heterociclo, al cual se encuentra unido el grupo CF₃, con sus átomos de nitrógeno interactúa electrostáticamente de manera desfavorable con el átomo de oxígeno del grupo OH de la cadena lateral de Tyr355. Por otra parte, el grupo tolueno dificulta el acceso al recoveco hidrofóbico, pero no ocupando el canal principal sino la parte superior del espacio existente entre Tyr385 y Ser530. Es importante notar que por encima de este grupo tolueno todavía queda algo de espacio libre, sin embargo, difícilmente un sustrato va a caber por éste. De manera similar, respecto al modo de unión del conformero *trans(E)* (panel B de la Figura 75), las interacciones entre este conformero del candidato 0 y la enzima h-COX-2 son las mismas que para el conformero *cis(Z)*. Sin embargo, existen dos diferencias notables respecto del modo de unión del conformero *cis(Z)*. La primera es la orientación del heterociclo, ya que en el conformero *cis(Z)*, éste se encuentra prácticamente paralelo al plano que contiene la cadena lateral de Tyr355, mientras que en el conformero *trans(E)*, éste se encuentra prácticamente perpendicular al plano que contiene la cadena lateral de dicho residuo. A pesar del cambio

de orientación del heterociclo comentado, las interacciones de éste con la enzima son las mismas para ambos conformeros. La segunda es la colocación del grupo tolueno, ya que en el conformero *cis(Z)*, éste ocupa la parte superior del espacio existente entre Tyr385 y Ser530, mientras que en el conformero *trans(E)*, éste ocupa el canal principal siendo su situación en dicho canal más profunda que en el caso del celecoxib. Por lo tanto, las simulaciones de MD para los dos conformeros del candidato 0 no hacen más que corroborar lo que ya indicaban los cálculos de *docking* para dichos conformeros. Considerando todos los resultados obtenidos para el candidato 0, se puede concluir que para el celecoxib, la introducción del grupo azo en sustitución del enlace C-C que une el heterociclo con el grupo tolueno no ha conducido a un compuesto derivado donde el conformero *cis(Z)* es un inhibidor respecto de la h-COX-2, mientras que el correspondiente conformero *trans(E)* no. De hecho, de los dos conformeros, el *trans(E)* es el que presenta un modo de unión más similar al celecoxib, cosa que sugiere que será el que presente una potencia inhibidora mayor.

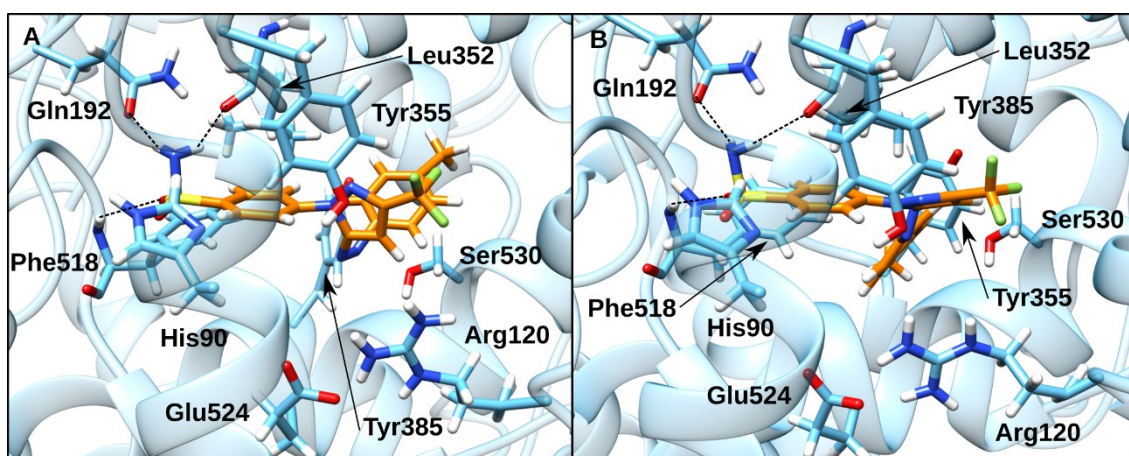


Figura 75. Representación del modo de unión dentro del centro activo COX de la h-COX-2 adoptado por los conformeros *cis(Z)* (panel A) y *trans(E)* (panel B) del candidato 0 del celecoxib a lo largo de su respectiva simulación de MD. Para cada conformero, se han indicado tanto los residuos más característicos del centro activo COX como los residuos que interaccionan de manera más intensa con el conformero del candidato 0 considerado. Los puentes de hidrógeno se han indicado con líneas negras discontinuas.

7.3.4 Obtención de candidatos prometedores mediante cálculos de *docking*

A partir de los resultados obtenidos para celecoxib y rofecoxib se determinó que la introducción de un grupo azo entre el anillo de benceno que contiene el grupo sulfonamida y el grupo tolueno sería la más desfavorable de todas las posibles. Esto se corroboró mediante cálculos de *docking* para algunos compuestos derivados que incorporaban un grupo azo en dicha posición, el conformero *cis(Z)* de los cuales ni tan siquiera era capaz de alojarse en el interior del centro activo COX de la h-COX-2 en la inmensa mayoría de casos y cuando era capaz de alojarse, dicho conformero presentaba un modo de unión que distaba mucho respecto del que exhibía el fármaco original. Por otra parte, los resultados

obtenidos para el candidato 0 sugieren que tanto para el celecoxib como para el rofecoxib la introducción del grupo azo en sustitución del enlace C-C que une el heterociclo con el anillo de benceno, el cual puede estar sustituido o no, que se aloja en el canal principal no tiene recorrido desde un punto de vista de diseñar inhibidores selectivos de la h-COX-2 que incorporen un fotointerruptor tipo AB.

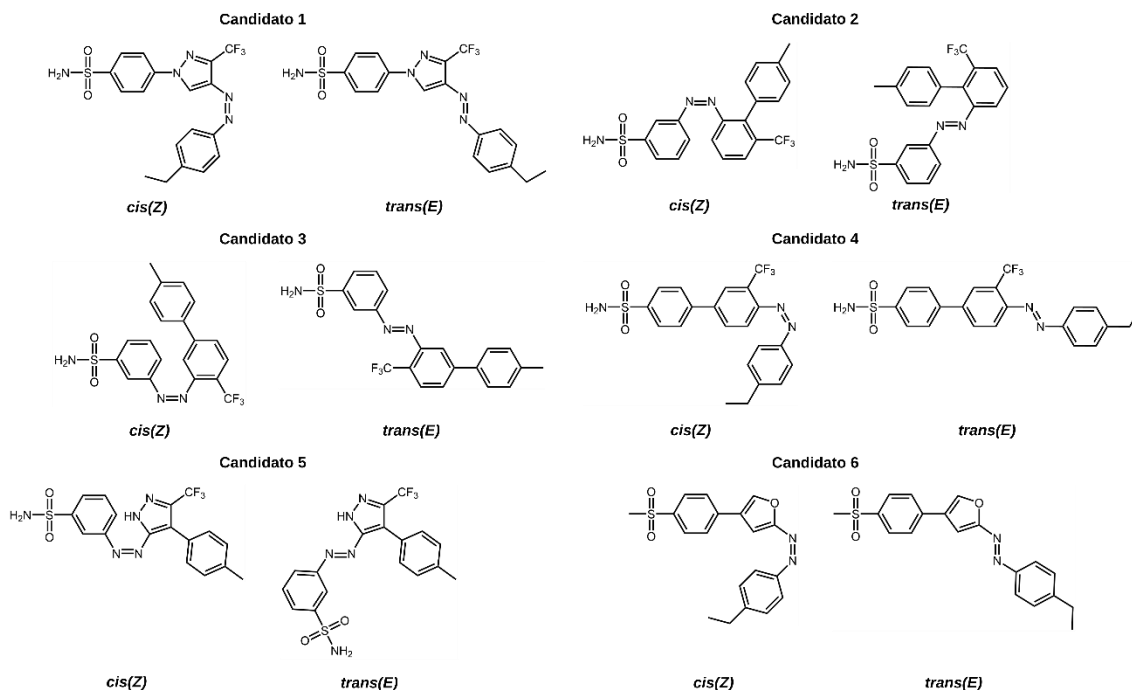


Figura 76. Estructura química de los seis candidatos prometedores diseñados. Para un candidato dado, se han representado ambos conformeros. Es preciso remarcar que en la posición donde se ha introducido el grupo azo, se ha eliminado el enlace simple que unía a los dos anillos en el compuesto original.

Una vez llegados a este punto, se procedió a diseñar un gran número de compuestos derivados que incorporaran el grupo azo teniendo en cuenta las consideraciones que se han expuesto en el párrafo anterior y mediante cálculos de *docking* se ha determinado si éstos eran prometedores o no para inhibir selectivamente la h-COX-2 únicamente con su conformero *cis(Z)*. El criterio utilizado para determinar si un compuesto derivado es prometedor fue que su conformero *cis(Z)* pudiera alojarse en el interior del centro activo COX de la h-COX-2, mientras que su conformero *trans(E)* no pudiera alojarse en el interior de éste. Aplicando este criterio a los compuestos derivados que fueron diseñados teniendo en cuenta las consideraciones que se han expuesto más arriba, se obtuvo un total de seis candidatos prometedores (ver Figura 76). Cabe destacar que algunos candidatos prometedores no contienen ningún heterociclo y en su lugar contienen otro anillo de benceno (candidatos 2, 3 y 4). La motivación de esta sustitución de anillos es que los fotointerruptores tipo AB que constan de dos anillos de benceno experimentan la fotoisomerización *trans(E)*-*cis(Z)* a longitudes de onda más próximas a la ventana óptica donde los tejidos vivos son moderadamente transparentes en comparación con los fotointerruptores tipo AB que constan de un heterociclo y un anillo de benceno. Por lo tanto, la obtención de candidatos prometedores que incorporen un fotointerruptor tipo

AB donde los dos anillos sean de benceno es interesante porque éstos tienen unas propiedades ópticas que los hacen más fácilmente aplicables desde un punto de vista fotofarmacológico.

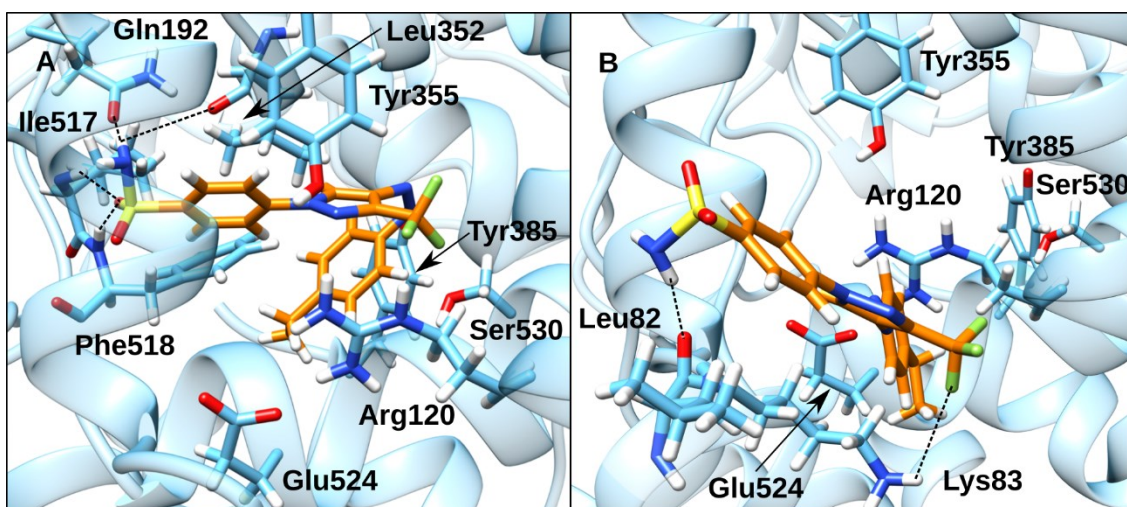


Figura 77. Representación del modo de unión con la h-COX-2 adoptado por los conformeros *cis(Z)* (panel A) y *trans(E)* (panel B) del candidato 1 según la mejor solución de los cálculos de *docking* realizados para dichos conformeros. Para cada conformero, se han indicado tanto los residuos más característicos del centro activo COX como los residuos que interactúan de manera más intensa con el conformero del candidato 1 considerado. Sin embargo, con el objetivo de representar el modo de unión para el conformero *cis(Z)* del candidato 1 (panel A) de la manera más clara posible, no se ha representado His90, ya que dificulta mucho la adecuada visualización de éste. Los puentes de hidrógeno se han indicado con líneas negras discontinuas.

En relación con el candidato 1, la mejor solución de *docking* para el conformero *cis(Z)* ya lo coloca dentro del centro activo COX de la h-COX-2 con un modo de unión muy similar al que exhibía el celecoxib (panel A de la Figura 77). Su grupo sulfonamida se encuentra en el interior del *sidepocket* formando cuatro puentes de hidrógeno, un átomo de hidrógeno del grupo NH₂ forma dos de estos puentes, uno con el grupo cetona de la cadena lateral de Gln192 y otro con el átomo de oxígeno del esqueleto de Leu352, mientras que uno de los átomos de oxígeno del grupo sulfonamida forma los otros dos puentes, uno con el grupo NH del esqueleto de Ile517 y otro con el grupo NH del esqueleto de Phe518. Cabe destacar que el puente de hidrógeno en el cual está implicada la Leu352 es bastante más débil que los otros tres. Además, este grupo sulfonamida interactúa electrostáticamente de manera favorable con His90. El grupo CF₃ interactúa electrostáticamente de manera favorable con Arg120, mientras que los átomos de nitrógeno del heterociclo interactúan electrostáticamente de manera desfavorable con el átomo de oxígeno del grupo OH de la cadena lateral de Tyr355, aunque esta última interacción es bastante débil. En último lugar, el grupo etilbenceno ocupa el canal principal, mientras que el grupo CF₃ y el heterociclo que lo contiene se encuentran ocupando la entrada, impidiendo la unión a Arg120 por parte de un grupo carboxilato de un sustrato, cosa que dificulta que éste pueda ocupar el recoveco hidrofóbico, ya que el

acceso a dicho residuo, el cual suele ser el responsable de la fijación de los diferentes sustratos, se encuentra bloqueado. Por otra parte, todas las soluciones de *docking* para el conformero *trans(E)* lo colocan fuera del centro activo COX. La mejor de estas soluciones (panel B de la Figura 77) lo emplaza sobre la entrada de dicho centro activo. Esta disposición del conformero *trans(E)* podría llegar a dificultar la unión al centro activo COX de un sustrato cualquiera y por ende inhibir en caso de ser estable. Dos puentes de hidrógeno mantienen al conformero *trans(E)* en esta disposición, uno es entre el grupo NH₂ de la sulfonamida y el átomo de oxígeno del esqueleto de Leu82, mientras que el otro es entre el grupo CF₃ y el grupo NH₃⁺ de la cadena lateral de Lys83 donde este último puente de hidrógeno es sustancialmente más débil que el primero.

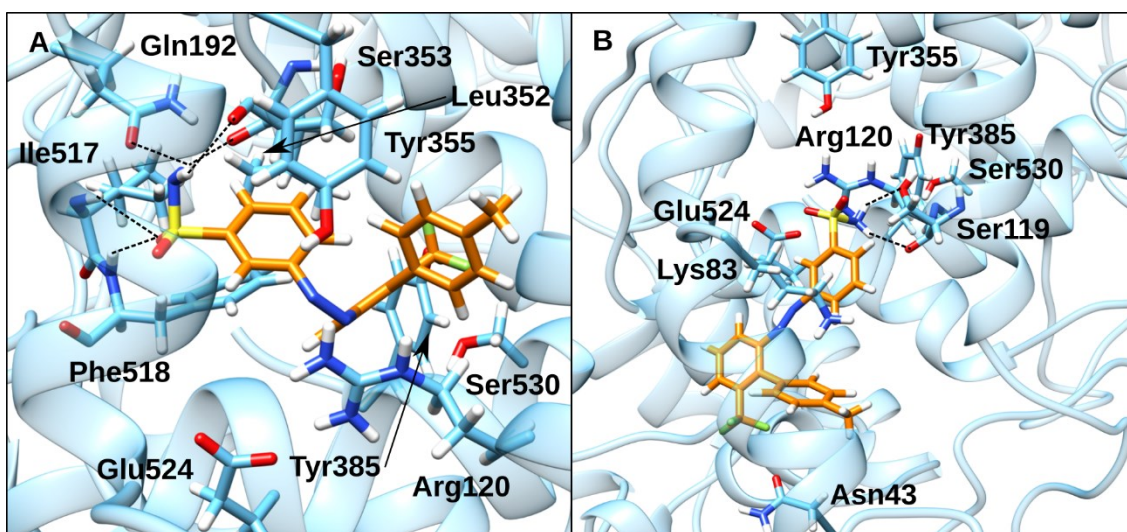


Figura 78. Representación del modo de unión con la h-COX-2 adoptado por los conformeros *cis(Z)* (panel A) y *trans(E)* (panel B) del candidato 2 según los cálculos de *docking* realizados para dichos conformeros. Para el conformero *cis(Z)* se ha representado la mejor solución del quinto mejor de sus clústeres, mientras que para el conformero *trans(E)* se ha representado la mejor de sus soluciones. Para cada conformero, se han indicado tanto los residuos más característicos del centro activo COX como los residuos que interactúan de manera más intensa con el conformero del candidato 2 considerado. Sin embargo, con el objetivo de representar el modo de unión para el conformero *cis(Z)* del candidato 2 (panel A) de la manera más clara posible, no se ha representado His90, ya que dificulta mucho la adecuada visualización de éste. Los puentes de hidrógeno se han indicado con líneas negras discontinuas.

En relación con el candidato 2, de los 38 clústeres formados a partir de las soluciones de *docking* para el conformero *cis(Z)*, únicamente el quinto mejor colocaba a dicho conformero en el interior del centro activo COX de la h-COX-2. En la mejor solución de este clúster (panel A de la Figura 78), el grupo sulfonamida se encuentra en el interior del *sidepocket*, aunque la disposición de éste es ligeramente diferente respecto de la disposición de dicho grupo para el celecoxib, formando cinco puentes de hidrógeno: 1) entre su grupo NH₂ y el grupo cetona de Gln192; 2) entre su grupo NH₂ y el átomo de oxígeno del esqueleto de Leu352; 3) entre su grupo NH₂ y el átomo de oxígeno del esqueleto de Ser353; 4) entre uno de sus átomos de oxígeno y el grupo NH del esqueleto

de Ile517; 5) entre el átomo de oxígeno anterior de la sulfonamida y el grupo NH del esqueleto de Phe518. Además, His90 interacciona electrostáticamente de manera favorable con el grupo sulfonamida. Por su parte, el grupo azo interacciona electrostáticamente de manera favorable con Arg120. Es preciso destacar que en la mejor solución del clúster en cuestión, el grupo CF₃ y el anillo de benceno que lo contiene se encuentran ocupando el canal principal mientras que el grupo tolueno se encuentra en la entrada, impidiendo la unión a Arg120 por parte de un grupo carboxilato de un sustrato, cosa que dificulta que éste pueda ocupar el recoveco hidrofóbico, ya que el acceso a dicho residuo, el cual suele ser el responsable de la fijación de los diferentes sustratos, se encuentra bloqueado. Todo esto hace que el modo de unión que presenta el conformero *cis(Z)* del candidato 2 difiera sustancialmente respecto del que muestra el celecoxib. Por otra parte, todas las soluciones de *docking* para el conformero *trans(E)* lo colocan fuera del centro activo COX. La mejor de estas soluciones (panel B de la Figura 78) lo emplaza con su grupo sulfonamida sobre la entrada, concretamente sobre la Arg120, aunque el resto del conformero se encontraría por debajo de dicha entrada, de manera que la unión de un sustrato al centro activo COX apenas se vería dificultada. En esta disposición, el conformero *trans(E)* forma dos puentes de hidrógeno, uno entre el grupo NH₂ de la sulfonamida y el átomo de oxígeno del esqueleto de Ser119 y el otro entre el grupo NH₂ anterior y el átomo de oxígeno del grupo OH de la cadena lateral de Ser119. Además, el grupo sulfonamida interacciona electrostáticamente de manera favorable con Arg120. El grupo azo también interacciona de manera favorable, pero con el grupo NH₃⁺ de la cadena lateral de Lys83. Por último, el grupo CF₃ interacciona electrostáticamente de manera favorable con el grupo NH₂ de la cadena lateral de Asn43.

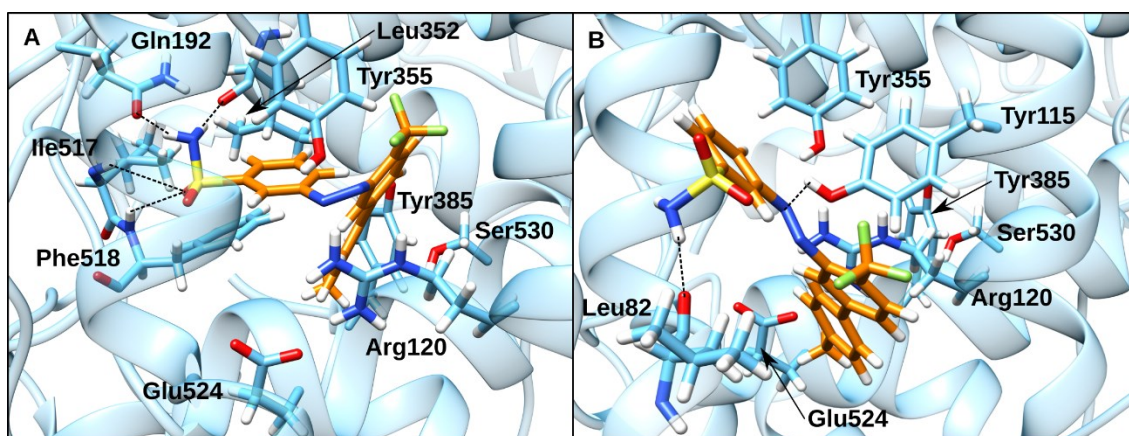


Figura 79. Representación del modo de unión con la h-COX-2 adoptado por los conformeros *cis(Z)* (panel A) y *trans(E)* (panel B) del candidato 3 según la mejor solución de los cálculos de *docking* realizados para dichos conformeros. Para cada conformero, se han indicado tanto los residuos más característicos del centro activo COX como los residuos que interaccionan de manera más intensa con el conformero del candidato 3 considerado. Sin embargo, con el objetivo de representar el modo de unión para el conformero *cis(Z)* del candidato 3 (panel A) de la manera más clara posible, no se ha representado His90, ya que dificulta mucho la adecuada visualización de éste. Los puentes de hidrógeno se han indicado con líneas negras discontinuas.

En relación con el candidato 3, la mejor solución de *docking* para el conformero *cis(Z)* ya lo coloca dentro del centro activo COX de la h-COX-2 con un modo de unión muy similar al que exhibía el celecoxib (panel A de la Figura 79). Su grupo sulfonamida se encuentra en el interior del *sidepocket* formando cuatro puentes de hidrógeno: 1) entre su grupo NH₂ y el grupo cetona de la cadena lateral de Gln192; 2) entre su grupo NH₂ y el átomo de oxígeno del esqueleto de Leu352; 3) entre uno de sus átomos de oxígeno y el grupo NH del esqueleto de Ile517; 4) entre el átomo de oxígeno anterior y el grupo NH del esqueleto de Phe518. Además, His90 interacciona electrostáticamente de manera favorable con el grupo sulfonamida. El grupo azo también interacciona electrostáticamente de manera favorable, pero con Arg120. En último lugar, el grupo tolueno ocupa el canal principal, mientras que el grupo CF₃ y el anillo de benceno que lo contiene se encuentran en la entrada, impidiendo la unión a Arg120 por parte de un grupo carboxilato de un sustrato, cosa que dificulta que éste pueda ocupar el recoveco hidrofóbico, ya que el acceso a dicho residuo, el cual suele ser el responsable de la fijación de los diferentes sustratos, se encuentra bloqueado. Por otra parte, todas las soluciones de *docking* para el conformero *trans(E)* lo colocan fuera del centro activo COX. La mejor de estas soluciones (panel B de la Figura 79) lo emplaza bloqueando la entrada de este centro activo, cosa que dificultaría la unión de cualquier sustrato a dicho centro activo. En esta disposición, el conformero *trans(E)* forma dos puentes de hidrógeno, uno entre el grupo NH₂ de la sulfonamida y el átomo de oxígeno del esqueleto de Leu82 y otro entre uno de los átomos de nitrógeno del grupo azo y el grupo OH de la cadena lateral de Tyr115.

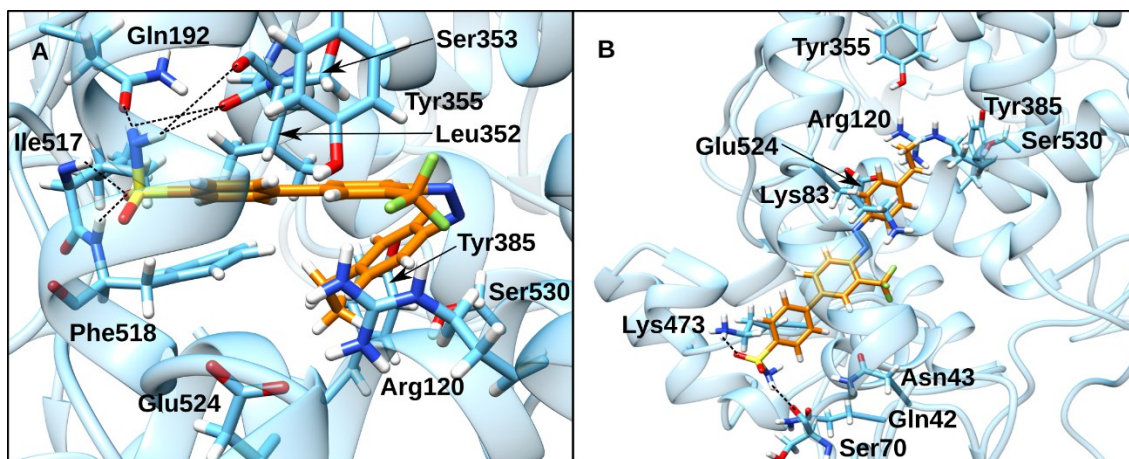


Figura 80. Representación del modo de unión con la h-COX-2 adoptado por los conformeros *cis(Z)* (panel A) y *trans(E)* (panel B) del candidato 4 según la mejor solución de los cálculos de *docking* realizados para dichos conformeros. Para cada conformero, se han indicado tanto los residuos más característicos del centro activo COX como los residuos que interaccionan de manera más intensa con el conformero del candidato 4 considerado. Sin embargo, con el objetivo de representar el modo de unión para el conformero *cis(Z)* del candidato 4 (panel A) de la manera más clara posible, no se ha representado His90, ya que dificulta mucho la adecuada visualización de éste. Los puentes de hidrógeno se han indicado con líneas negras discontinuas.

En relación con el candidato 4, la mejor solución de *docking* para el conformero *cis(Z)* ya lo coloca dentro del centro activo COX de la h-COX-2 con un modo de unión muy similar al que exhibía el celecoxib (panel A de la Figura 80). Su grupo sulfonamida se encuentra en el interior del *sidepocket* formando seis puentes de hidrógeno: 1) entre un átomo de hidrógeno del grupo NH₂ y el grupo cetona de la cadena lateral de Gln192; 2) entre el átomo de hidrógeno anterior y el átomo de oxígeno del esqueleto de Leu352; 3) entre el otro átomo de hidrógeno del grupo NH₂ y el átomo de oxígeno del esqueleto de Leu352; 4) entre el átomo de hidrógeno anterior y el átomo de oxígeno del esqueleto de Ser353; 5) entre uno de sus átomos de oxígeno y el grupo NH del esqueleto de Ile517; 6) entre el átomo de oxígeno anterior y el grupo NH del esqueleto de Phe518. Además, His90 interacciona electrostáticamente de manera favorable con el grupo sulfonamida. El grupo CF₃ interacciona electrostáticamente tanto con Arg120, de manera favorable, como con Tyr355, de manera desfavorable, aunque la primera de estas interacciones electrostáticas es la dominante. En último lugar, el grupo CF₃ y el anillo de benceno que lo contiene se encuentran ocupando la entrada, mientras que el grupo etilbenceno se encuentra ocupando el canal principal. Por otra parte, todas las soluciones de *docking* para el conformero *trans(E)* lo colocan fuera del centro activo COX. La mejor de estas soluciones (panel B de la Figura 80) lo emplaza con su grupo etilbenceno sobre la entrada, concretamente sobre la Arg120, mientras que el resto del conformero se encuentra por debajo de dicha entrada, de manera que la unión de un sustrato al centro activo COX apenas se vería dificultada. En esta disposición, el conformero *trans(E)* forma dos puentes de hidrógeno, uno entre el grupo NH₂ de la sulfonamida y el átomo de oxígeno del esqueleto de Ser70 y otro entre uno de los átomos de oxígeno del grupo sulfonamida y el grupo NH₃⁺ de la Lys473. Además, el grupo sulfonamida interacciona electrostáticamente de manera favorable con el grupo OH de la cadena lateral de Ser70, mientras que el grupo NH₂ de dicha sulfonamida interacciona también electrostáticamente de manera favorable con las cadenas laterales de Gln42 y Asn43. Por último, el grupo NH₃⁺ de la cadena lateral de Lys83 interacciona de manera favorable tanto con el grupo CF₃ como con el grupo azo.

En relación con el candidato 5, de los 37 clústeres formados a partir de las soluciones de *docking* para el conformero *cis(Z)*, únicamente el séptimo mejor colocaba a dicho conformero en el interior del centro activo COX de la h-COX-2. En la mejor solución de este clúster (panel A de la Figura 81), el grupo sulfonamida se encuentra en el interior del *sidepocket* formando cinco puentes de hidrógeno: 1) entre uno de los átomos de hidrógeno del grupo NH₂ y el grupo cetona de la cadena lateral de Gln192; 2) entre el otro átomo de hidrógeno del grupo NH₂ y el átomo de oxígeno del esqueleto de Leu352; 3) entre el átomo de hidrógeno anterior y el átomo de oxígeno del esqueleto de Ser353; 4) entre uno de los átomos de oxígeno y el grupo NH del esqueleto de Ile517; 5) entre el átomo de oxígeno anterior y el grupo NH del esqueleto de Phe518. Cabe destacar que el tercero de los puentes de hidrógeno que se acaban de enumerar es sustancialmente más débil que los demás. Además, el otro átomo de oxígeno de la sulfonamida interacciona electrostáticamente de manera favorable con His90. Por su parte, el grupo azo interacciona electrostáticamente tanto con Arg120 como con Tyr355, en conjunto estas interacciones electrostáticas son favorables. En cambio, el grupo CF₃ interacciona electrostáticamente de manera desfavorable con el grupo OH de la cadena lateral de

Ser530. Es importante decir que en la mejor solución del clúster en cuestión, el grupo CF_3 y el heterociclo que lo contiene se encuentran ocupando el canal principal, mientras que el grupo tolueno se encuentra en la entrada, impidiendo la unión a Arg120 por parte de un grupo carboxilato de un sustrato, cosa que dificulta que éste pueda ocupar el recoveco hidrofóbico, ya que el acceso a dicho residuo, el cual suele ser el responsable de la fijación de los diferentes sustratos, se encuentra bloqueado. Todo esto hace que el modo de unión que presenta el conformero *cis(Z)* del candidato 5 difiera sustancialmente respecto del que muestra el celecoxib. Por otra parte, todas las soluciones de *docking* para el conformero *trans(E)* lo colocan fuera del centro activo COX. La mejor de estas soluciones (panel B de la Figura 81) lo emplaza bloqueando la entrada de dicho centro activo, cosa que dificultaría enormemente la unión de cualquier sustrato al centro activo COX. El conformero *trans(E)* está sujeto en esta disposición mediante dos puentes de hidrógeno: 1) entre el grupo NH_2 de la sulfonamida y el átomo de oxígeno del esqueleto de Ser119; 2) entre uno de los átomos de oxígeno de la sulfonamida y el grupo NH_3^+ de la cadena lateral de Lys83. Además, el grupo azo interacciona electrostáticamente de manera favorable con el átomo de hidrógeno del grupo OH de la cadena lateral de Tyr115.

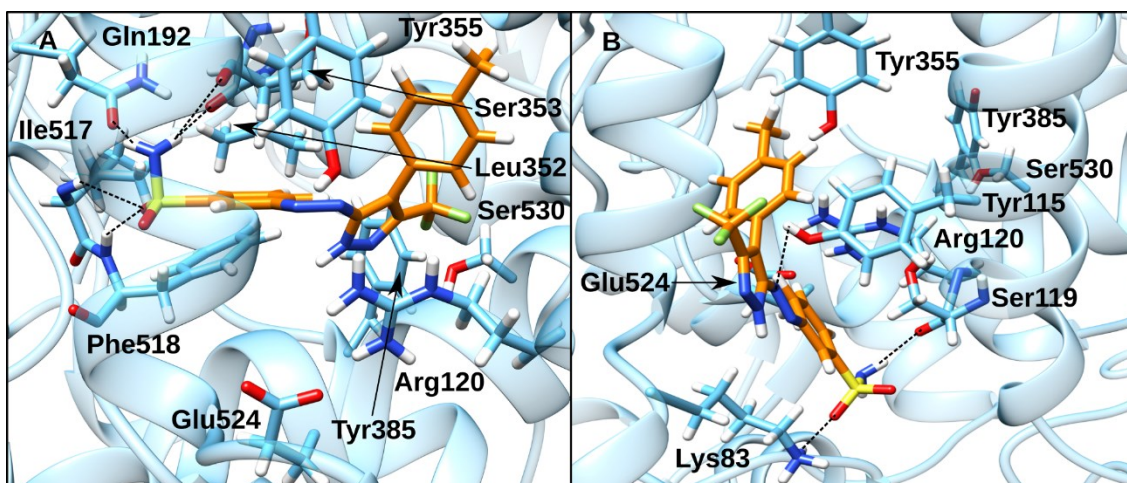


Figura 81. Representación del modo de unión con la h-COX-2 adoptado por los conformeros *cis(Z)* (panel A) y *trans(E)* (panel B) del candidato 5 según los cálculos de *docking* realizados para dichos conformeros. Para el conformero *cis(Z)* se ha representado la mejor solución del séptimo mejor de sus clústeres, mientras que para el conformero *trans(E)* se ha representado la mejor de sus soluciones. Para cada conformero, se han indicado tanto los residuos más característicos del centro activo COX como los residuos que interactúan de manera más intensa con el conformero del candidato 5 considerado. Sin embargo, con el objetivo de representar el modo de unión para el conformero *cis(Z)* del candidato 5 (panel A) de la manera más clara posible, no se ha representado His90, ya que dificulta mucho la adecuada visualización de éste. Los puentes de hidrógeno se han indicado con líneas negras discontinuas.

En relación con el candidato 6, la mejor solución de *docking* para el conformero *cis(Z)* ya lo coloca dentro del centro activo COX de la h-COX-2 con un modo de unión muy similar al que exhibía el rofecoxib (este es el único candidato que está inspirado en dicho fármaco) (panel A de la Figura 82). Su grupo metanosulfonilo se encuentra en el interior del

sidepocket formando dos puentes de hidrógeno: 1) entre uno de sus átomos de oxígeno y el grupo NH del esqueleto de Ile517; 2) entre el átomo de oxígeno anterior y el grupo NH del esqueleto de Phe518. Además, el grupo metanosulfonilo establece cuatro interacciones electrostáticas estabilizantes: 1) con el grupo NH₂ de la cadena lateral de Gln192; 2) con la cadena lateral de His90; 3) con el grupo NH del esqueleto de Arg513; 4) con la cadena lateral de Arg513. El grupo azo interacciona electrostáticamente de manera favorable con Arg120. En último lugar, el heterociclo se encuentra ocupando la entrada, mientras que el grupo etilbenceno se encuentra ocupando el canal principal. Por otra parte, todas las soluciones de *docking* para el conformero *trans(E)* lo colocan fuera del centro activo COX. La mejor de estas soluciones (panel B de la Figura 82) lo emplaza en la parte inferior izquierda de la entrada, pero sin estar sobre ésta, de manera que la unión de un sustrato al centro activo COX apenas se vería dificultada. En esta disposición, el conformero *trans(E)* forma tres puentes de hidrógeno: 1) entre un átomo de oxígeno del grupo metanosulfonilo y el grupo NH₂ de la cadena lateral de Asn87; 2) entre el otro átomo de oxígeno del grupo metanosulfonilo y el grupo NH₂ de la cadena lateral de Asn87; 3) entre el átomo de oxígeno del heterociclo y el grupo NH del esqueleto de Lys473.

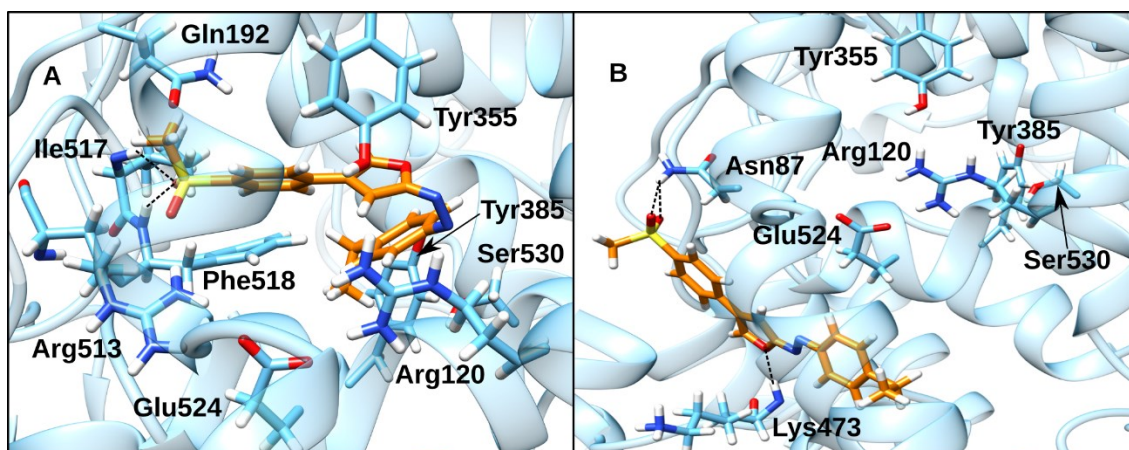


Figura 82. Representación del modo de unión con la h-COX-2 adoptado por los conformeros *cis(Z)* (panel A) y *trans(E)* (panel B) del candidato 6 según la mejor solución de los cálculos de *docking* realizados para dichos conformeros. Para cada conformero, se han indicado tanto los residuos más característicos del centro activo COX como los residuos que interaccionan de manera más intensa con el conformero del candidato 6 considerado. Sin embargo, con el objetivo de representar el modo de unión para el conformero *cis(Z)* del candidato 6 (panel A) de la manera más clara posible, no se ha representado His90, ya que dificulta mucho la adecuada visualización de éste. Los puentes de hidrógeno se han indicado con líneas negras discontinuas.

Finalmente, el análisis de los modos de unión para ambos conformeros de los seis candidatos prometedores sugiere que los candidatos 1, 3, 4 y 6 son los que tienen mayor potencial de inhibir selectivamente a la h-COX-2 con su conformero *cis(Z)*, ya que los conformeros *cis(Z)* de dichos candidatos presentan un modo de unión al centro activo COX de la h-COX-2 muy similar al que exhibía el fármaco de partida, mientras que los conformeros *trans(E)* de éstos permanecen fuera de dicho centro activo sin impedir la unión de sustrato. Además, si se compara la mejor solución de *docking* que coloca al

conformero *cis(Z)* en el interior del centro activo COX de los diferentes candidatos prometedores, se puede observar que las soluciones para los candidatos 1, 3, 4 y 6 presentan un mejor *ranking* dentro de su conjunto de soluciones y un mejor *score* en comparación con las soluciones de los candidatos 2 y 5, cosa que apunta en la misma dirección que el análisis de los modos de unión comentado anteriormente.

7.3.5 Simulaciones de MD para los candidatos prometedores de mayor potencial

Con el objetivo de comprobar la estabilidad del modo de unión del conformero *cis(Z)* para los candidatos prometedores de mayor potencial (ver sección 7.3.4), se ha calculado una simulación de MD de una longitud de 100 ns para el conformero *cis(Z)* de cada uno de estos candidatos. Además, para testear la capacidad inhibidora del conformero *trans(E)*, también se ha realizado una simulación de MD para dicho conformero de cada uno de los candidatos prometedores de mayor potencial, donde la longitud de estas simulaciones ha dependido del candidato considerado.

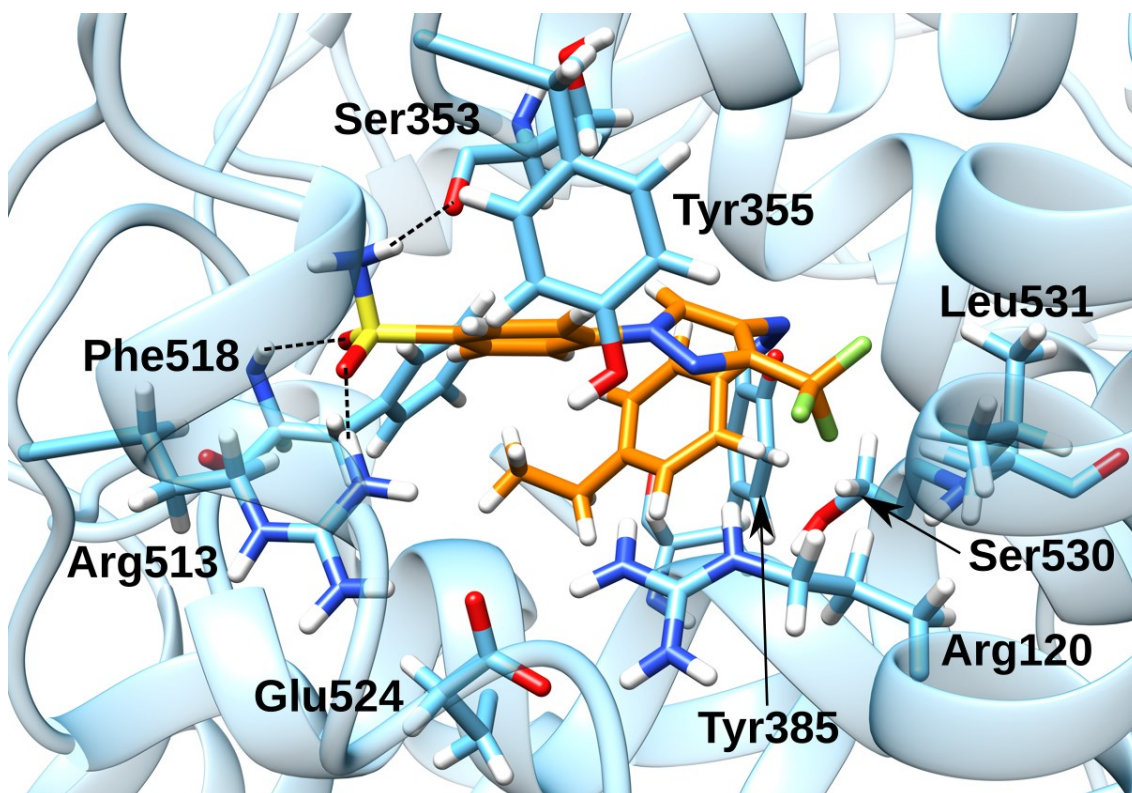


Figura 83. Representación del modo de unión dentro del centro activo COX de la h-COX-2 adoptado por el conformero *cis(Z)* del candidato 1 a lo largo de su simulación de MD. Se han indicado tanto los residuos más característicos del centro activo COX como los residuos que interaccionan de manera más intensa con dicho conformero del candidato 1. Sin embargo, con el objetivo de representar el modo de unión para el conformero *cis(Z)* del candidato 1 de la manera más clara posible, no se ha representado His90, ya que dificulta mucho la adecuada visualización de éste. Los puentes de hidrógeno se han indicado con líneas negras discontinuas.

En relación con las simulaciones de MD para el candidato 1, se puede apreciar que el conformero *cis(Z)* a lo largo de su simulación de MD adopta un modo de unión en el interior del centro activo COX de la h-COX-2 muy similar al que mostraban los cálculos de *docking* para dicho conformero y al que exhibía el celecoxib (Figura 83). Su grupo sulfonamida se encuentra en el interior del *sidepocket* formando tres puentes de hidrógeno: 1) entre su grupo NH₂ y el átomo de oxígeno del esqueleto de Ser353; 2) entre uno de sus dos átomos de oxígeno y un grupo NH₂ de la cadena lateral de Arg513; 3) entre el otro átomos de oxígeno y el grupo NH del esqueleto de Phe518. Este último puente de hidrógeno es sustancialmente más débil que el resto que se acaban de enumerar. Además, His90 interacciona electrostáticamente de manera favorable con dicha sulfonamida. Por su parte, el heterociclo interacciona electrostáticamente de manera favorable con Arg120, mientras que el grupo CF₃ lo hace con Arg120 y Leu531 (grupo NH del esqueleto). En último lugar, el grupo CF₃ y el heterociclo que lo contiene se encuentran ocupando la entrada del centro activo COX, mientras que el grupo etilbenceno se encuentra ocupando el canal principal de dicho centro activo. Todo esto, dificulta la unión de cualquier sustrato al centro activo COX. Por otra parte, se necesitaron 300 ns para que el conformero *trans(E)* se separara de la enzima y pasara a formar parte de la solución acuosa que envuelve a ésta, es decir, para romper todas las interacciones entre la enzima y dicho conformero. Considerándolo todo, parece bastante claro que el conformero *cis(Z)* del candidato 1 inhibiría selectivamente la h-COX-2, mientras que el conformero *trans(E)* de dicho candidato no tendría ningún efecto inhibitor, ya que se estabiliza más en solución acuosa que interaccionado con la enzima.

En relación con las simulaciones de MD para el candidato 3, se puede apreciar que el conformero *cis(Z)* a lo largo de su simulación de MD adopta un modo de unión en el interior del centro activo COX de la h-COX-2 que dista bastante respecto al que mostraban los cálculos de *docking* para dicho conformero y al que exhibía el celecoxib (Figura 84). Aunque el grupo sulfonamida se encuentra en el interior del *sidepocket*, el grupo CF₃ y el anillo de benceno que lo contiene ocupando la entrada y la parte superior del espacio existente entre Tyr385 y Ser530, cosa que bloquea el acceso al recoveco hidrofóbico, y el grupo tolueno ocupando el canal principal, se puede apreciar que dicha sulfonamida adopta una disposición muy diferente en el interior del *sidepocket* en comparación con las que se han observado previamente, ya que ahora no sólo se encuentra el grupo sulfonamida en el interior de dicha cavidad, sino que también el anillo de benceno que lo contiene. Esta sobreocupación del *sidepocket* induce cambios conformacionales importantes a la enzima, que se pueden apreciar tanto en dicho *sidepocket* como en la entrada, ya que se encuentran considerablemente deformados respecto de la forma que presentaban anteriormente. Respecto a las interacciones que establece el conformero *cis(Z)* con la enzima, su grupo sulfonamida forma un puente de hidrógeno fuerte, entre el grupo NH₂ y el grupo OH de la cadena lateral de Ser353, y un serie de puentes de hidrógeno débiles, donde los más destacados serían los siguientes: 1) entre uno de sus átomos de oxígeno y el grupo OH de la cadena lateral de Ser353; 2) entre el mismo átomo de oxígeno y el grupo NH del esqueleto de Phe518; 3) entre el otro átomo de oxígeno y el grupo NH del esqueleto de Ala527; 4) entre el átomo de nitrógeno del grupo NH₂ y un grupo NH₂ de la cadena lateral de Arg513. El grupo azo interacciona electrostáticamente de manera favorable con Arg120, mientras que el grupo CF₃ presenta una clara repulsión

electrostática con el átomo de oxígeno del esqueleto de Ser530. Por todo lo que se acaba de exponer, aunque el conformero *cis(Z)* del candidato 3 puede inhibir selectivamente h-COX-2, no parece que éste sea uno de los candidatos prometedores de mayor potencial más adecuado, ya que su conformero *cis(Z)* presenta un modo de unión en el interior del centro activo COX muy diferente respecto del que presenta el celecoxib y, además, distorsiona considerablemente la forma del *sidepocket* y de la entrada de la enzima. Por otra parte, con el objetivo de comprobar la capacidad inhibidora del conformero *trans(E)*, se ha calculado una simulación de MD de 300 ns para éste donde se puede apreciar que dicho conformero pasa a formar parte de la solución acuosa que rodea a la enzima. Por lo tanto, a pesar de que el conformero *trans(E)* no poseería ninguna capacidad inhibidora, debido a lo que se ha comentado anteriormente en relación con el conformero *cis(Z)* se puede concluir que el candidato 3 no posee un gran potencial desde un punto de vista de su aplicación fotofarmacológica.

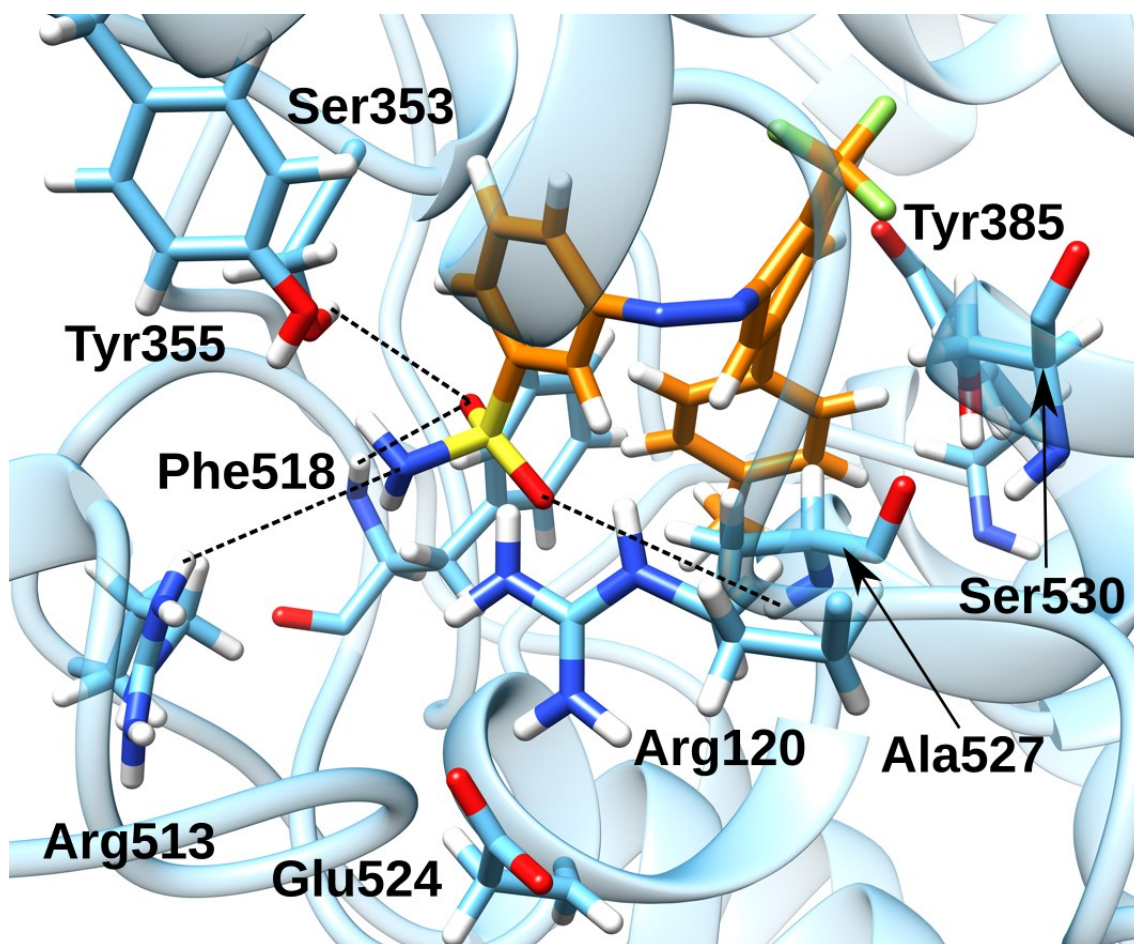


Figura 84. Representación del modo de unión dentro del centro activo COX de la h-COX-2 adoptado por el conformero *cis(Z)* del candidato 3 a lo largo de su simulación de MD. Se han indicado tanto los residuos más característicos del centro activo COX como los residuos que interaccionan de manera más intensa con dicho conformero del candidato 3. Los puentes de hidrógeno más fuertes se han indicado con líneas negras discontinuas.

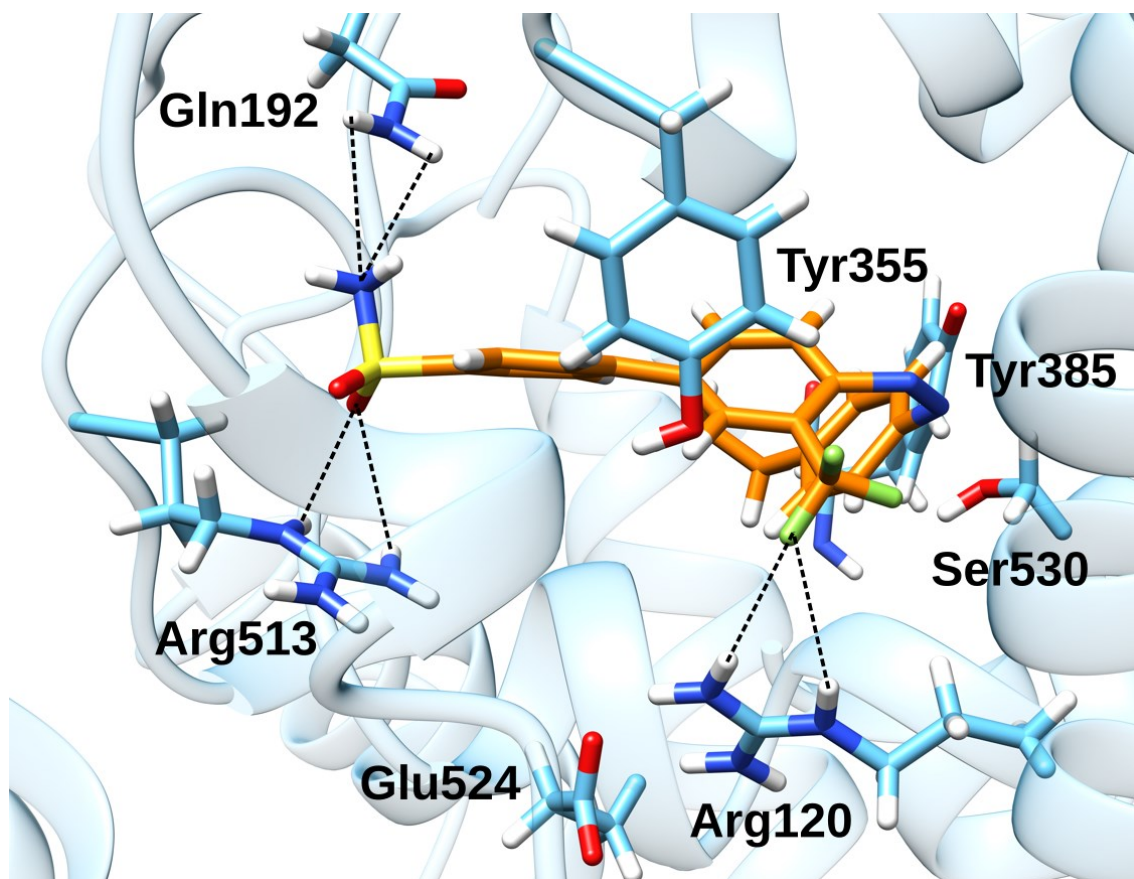


Figura 85. Representación del modo de unión dentro del centro activo COX de la h-COX-2 adoptado por el conformero *cis(Z)* del candidato 4 a lo largo de su simulación de MD. Se han indicado tanto los residuos más característicos del centro activo COX como los residuos que interaccionan de manera más intensa con dicho conformero del candidato 4. Los puentes de hidrógeno más fuertes se han indicado con líneas negras discontinuas.

En relación con las simulaciones de MD para el candidato 4, se puede apreciar que el conformero *cis(Z)* a lo largo de su simulación de MD adopta un modo de unión en el interior del centro activo COX de la h-COX-2 muy similar al que mostraban los cálculos de *docking* para dicho conformero y al que exhibía el celecoxib (Figura 85). Su grupo sulfonamida se encuentra en el interior del *sidepocket* y forma puentes de hidrógeno con Gln192 y Arg513. Respecto a Gln192, se forman dos puentes de hidrógeno entre el átomo de nitrógeno del grupo NH_2 de la sulfonamida y el grupo NH_2 de la cadena lateral de dicho residuo (uno para cada átomo de hidrógeno). En cambio, respecto a Arg513, se forma una red de puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno de la sulfonamida y la cadena lateral de dicho residuo, donde dos de estos puentes de hidrógeno son sustancialmente más fuertes que el resto (ver Figura 85). Con el grupo CF_3 se tiene una situación similar a lo que se acaba de comentar, se establece una red de puentes de hidrógeno entre dicho grupo y la cadena lateral de Arg120 donde, otra vez, dos de estos puentes de hidrógeno son sustancialmente más fuertes que el resto (ver Figura 85). Por último, el grupo etilbenceno se encuentra ocupando el canal principal, mientras que el grupo CF_3 y el anillo de benceno que lo contiene ocupan la entrada, impidiendo la unión a Arg120 por parte de un grupo carboxilato de un sustrato, cosa que dificulta que éste

pueda ocupar el recoveco hidrofóbico, ya que el acceso a dicho residuo, el cual suele ser el responsable de la fijación de los diferentes sustratos, se encuentra bloqueado. Por otra parte, después de una simulación de MD de 450 ns, el conformero *trans(E)* se ha desplazado por debajo de los tres residuos que conforman la entrada del centro activo COX (Arg120, Tyr355 y Glu524), pero sigue interactuando con la enzima. En esta disposición, dicho conformero apenas dificultaría la unión de un sustrato cualquiera al centro activo COX y, por lo tanto, su capacidad inhibidora sería despreciable. Además, dado que las interacciones que mantienen unido el conformero *trans(E)* a la enzima son muy débiles, lo más probable es que dicho conformero se separe de la enzima y pase a la solución que la envuelve al alargar esta simulación de MD. Por todo lo expuesto, parece claro que el candidato 4 es un candidato prometedor que posee un gran potencial, ya que su conformero *cis(Z)* inhibiría selectivamente a la h-COX-2, mientras que su conformero *trans(E)* no tendría capacidad inhibidora alguna. Además, dicho candidato contiene un fotointerruptor tipo AB que consta de dos anillos de benceno, cosa que mejora sus propiedades ópticas desde un punto de vista de experimentar la fotoisomerización *trans(E)*-*cis(Z)* dentro de la ventana óptica de los tejidos vivos.

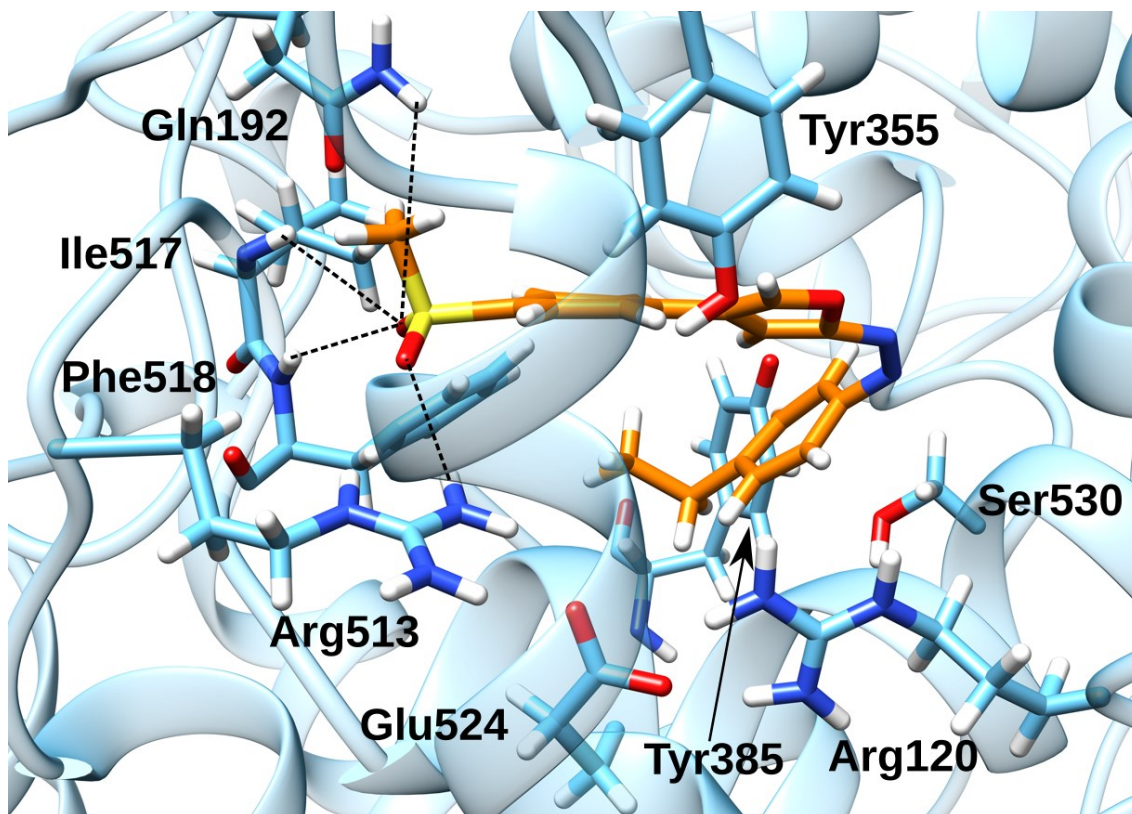


Figura 86. Representación del modo de unión dentro del centro activo COX de la h-COX-2 adoptado por el conformero *cis(Z)* del candidato 6 a lo largo de su simulación de MD. Se han indicado tanto los residuos más característicos del centro activo COX como los residuos que interactúan de manera más intensa con dicho conformero del candidato 6. Sin embargo, con el objetivo de representar el modo de unión para el conformero *cis(Z)* del candidato 6 de la manera más clara posible, no se ha representado His90, ya que dificulta mucho la adecuada visualización de éste. Los puentes de hidrógeno se han indicado con líneas negras discontinuas.

En relación con las simulaciones de MD para el candidato 6, se puede apreciar que el conformero *cis(Z)* a lo largo de su simulación de MD adopta un modo de unión en el interior del centro activo COX de la h-COX-2 muy similar al que mostraban los cálculos de *docking* para dicho conformero y al que exhibía el rofecoxib (Figura 86). Su grupo metanosulfonilo se encuentra en el interior del *sidepocket* formando cuatro puentes de hidrógeno: 1) entre uno de sus átomos de oxígeno y el grupo NH₂ de la cadena lateral de Gln192; 2) entre el átomo de oxígeno anterior y el grupo NH del esqueleto de Ile517; 3) entre el átomo de oxígeno anterior y el grupo NH del esqueleto de Phe518; 4) entre el otro átomo de oxígeno y uno de los grupos NH₂ de la cadena lateral de Arg513. Además, His90 interacciona electrostáticamente de manera favorable con uno de los átomos de oxígeno del grupo metanosulfonilo. El heterociclo también interacciona electrostáticamente de manera favorable, pero con Arg120. Por último, el grupo etilbenceno se encuentra ocupando el canal principal, mientras que el grupo azo y el heterociclo que lo contiene se encuentran ocupando la entrada, impidiendo la unión a Arg120 por parte de un grupo carboxilato de un sustrato, cosa que dificulta que éste pueda ocupar el recoveco hidrofóbico, ya que el acceso a dicho residuo, el cual suele ser el responsable de la fijación de los diferentes sustratos, se encuentra bloqueado. Por otra parte, después de una simulación de MD de 300 ns, el conformero *trans(E)* se ha desplazado por debajo de los tres residuos que conforman la entrada del centro activo COX (Arg120, Tyr355 y Glu524), pero sigue unido a la enzima. En esta disposición, dicho conformero apenas dificultaría la unión de un sustrato cualquiera al centro activo COX y, por lo tanto, su capacidad inhibidora sería despreciable. Además, dado que las interacciones que mantienen unido el conformero *trans(E)* a la enzima son muy débiles, lo más probable es que dicho conformero se separe de la enzima y pase a la solución que la envuelve al alargar esta simulación de MD. Por todo lo expuesto, parece claro que el candidato 6 también es un candidato prometedor que posee un gran potencial, ya que su conformero *cis(Z)* inhibiría selectivamente a la h-COX-2, mientras que su conformero *trans(E)* no tendría capacidad inhibidora alguna.

Una vez analizadas las simulaciones de MD de los candidatos prometedores de mayor potencial, se puede concluir que los candidatos 1, 4 y 6 serían los que tienen mejores perspectivas, ya que según nuestros cálculos sus respectivos conformeros *cis(Z)* inhibirían selectivamente la h-COX-2 y exhibirían un modo de unión al centro activo COX muy similar al fármaco de partida, mientras que sus respectivos conformeros *trans(E)* difícilmente tendrían una potencia inhibidora para dicha enzima. De entre los candidatos que se acaban de enumerar, el candidato 4, debido a sus mejores propiedades ópticas desde un punto de vista de ser aplicable en fotofarmacología, se ha escogido para ser sintetizado y evaluado como inhibidor selectivo *cis(Z)-trans(E)* de la h-COX-2.

7.3.6 Conclusiones

Mediante cálculos de *docking* y simulaciones de MD se ha estudiado el modo de unión al centro activo COX de la h-COX-2 de los fármacos celecoxib y rofecoxib, donde los resultados obtenidos para el primer fármaco son compatibles con las estructuras cristalográficas de los diferentes complejos de Michaelis COX-2-celecoxib disponibles. Este conocimiento sobre el modo de unión de estos fármacos al centro activo COX ha

permitido determinar qué posiciones de éstos son más favorables para la introducción de un grupo azo generando compuestos derivados fotofarmacológicamente activos. De entre todos los compuestos derivados diseñados, el candidato 4 es el que suscita más interés, ya que posee unas propiedades ópticas que lo hacen más viable para poder ser aplicado dentro de la ventana óptica de los tejidos vivos y que su conformero *cis(Z)* inhibiría selectivamente a la h-COX-2, mientras que su conformero *trans(E)* difícilmente inhibiría a dicha enzima. Por todo esto, dicho candidato ha sido seleccionado para ser sintetizado y evaluado como inhibidor selectivo *cis(Z)-trans(E)* de la COX-2 y con él están trabajando actualmente los grupos experimentales anteriormente mencionados.

Capítulo 8

Estudio del mecanismo de formación de LTA_4 en la ruta biosintética de AA catalizada por la 5-LOX humana

8.1 Introducción

Probablemente, la 5-LOX humana (h-5-LOX) es el miembro más relevante y desafiante de la familia de las LOXs. Su importancia radica en su actividad proinflamatoria y antiinflamatoria, más concretamente, cuando su actividad enzimática no está acoplada a otras LOXs, la 5-LOX transforma al AA en leucotrienos, que tienen propiedades proinflamatorias, mientras que cuando su actividad enzimática está acoplada a 12/15-LOX, la 5-LOX puede conducir a la síntesis de lipoxinas, que tienen propiedades antiinflamatorias, mediante un proceso transcelular^{69,373,374}. De hecho, se ha propuesto la conversión de la 5-LOX en una enzima que exhiba su actividad lipoxigenasa en posición 15 como una estrategia interesante para inducir la síntesis de lipoxinas y, por lo tanto, para convertir una actividad inflamatoria en una antiinflamatoria^{27,70,375}. Por consiguiente, comprender los factores que controlan las propiedades catalíticas de las LOXs, particularmente sus regioselectividades y estereoselectividades, es de vital importancia para propósitos biomédicos y biotecnológicos.

Como ya se ha comentado en la sección 1.2.2.2, se dispone de diversas estructuras cristalográficas de la h-5-LOX, incluyendo una que tiene el AA como sustrato. Sin embargo, todas estas estructuras se han obtenido para *human Stable-5-LOX* (PDB code 3O8Y)⁴⁰, un mutante solubilizado y estabilizado de la 5-LOX humana. Por otra parte, nuestro grupo de investigación realizó un estudio teórico del mecanismo catalítico para este mutante con el AA como sustrato⁴², aunque los resultados de éste no se acaban de

ajustar a los datos experimentales obtenidos para la h-5-LOX. Por todo esto, a lo largo del capítulo 8 se va a desarrollar para la 5-LOX humana *wild-type* el primer estudio computacional de los modos de unión y reactividad del AA, el cual es su sustrato natural, mediante un enfoque multiescala que combina cálculos de *docking*, simulaciones de MD y cálculos QM/MM. Es necesario remarcar que como no se encuentra disponible ninguna estructura experimental de la h-5-LOX *wild-type*, se ha utilizado la estructura proporcionada por AlphaFold (ver sección 1.2.2.2) para dicha enzima.

8.2 Metodología

En primer lugar, es importante notar que a lo largo de todo el capítulo 8 se va a utilizar la numeración de los residuos correspondiente a la estructura proporcionada por AlphaFold para la 5-LOX humana *wild-type*, ya que dicha estructura ha sido la utilizada para realizar los diferentes cálculos que se van a exponer a lo largo de la sección 8.3.

A la estructura monomérica que proporciona AlphaFold de la h-5-LOX se ha añadido el cofactor Fe(III)-OH⁻ del centro catalítico, ya que no lo contenía. Por otra parte, se ha modificado la disposición espacial y conformación de los residuos Val672, Ala673 y Ile674 (residuo terminal) para permitir que el grupo carboxilato terminal de este último residuo pueda coordinarse al átomo de hierro del cofactor Fe(III)-OH⁻. Mediante un solapamiento de la estructura proporcionada por AlphaFold para la h-5-LOX *wild-type* con una de las estructuras cristalográficas disponibles para la *human Stable-5-LOX* (*PDB code* 3O8Y)⁴⁰, se han obtenido las coordenadas Cartesianas para el átomo de hierro y para los átomos pesados de Val672, Ala673 y Ile674. Sin embargo, el grupo OH⁻ del cofactor Fe(III)-OH⁻ se ha colocado de manera manual teniendo en cuenta la posición del resto de integrantes de la esfera de coordinación del átomo de hierro. La estructura resultante del procedimiento que se acaba de exponer se ha protonado con el servidor web H⁺⁺^{246,247}, empleando un pH = 7.5 para los residuos titulables. El estado de protonación para la esfera de coordinación del átomo de hierro se corrigió a mano para asegurar una correcta descripción de ésta. Se ha utilizado este valor de pH debido a que para éste se dispone de datos experimentales de la actividad catalítica de la h-5-LOX *wild-type* con el AA como sustrato³².

Se utilizó el programa GOLD5.8.0²⁴⁸ para realizar los cálculos de *docking* del AA dentro de la cavidad de la h-5-LOX, donde se empleó como receptor la estructura relajada resultante del procedimiento expuesto en el párrafo anterior. Se definió el lugar de unión como una esfera de 20 Å de radio centrada en el átomo de Fe. El receptor se mantuvo rígido, pero se le confirió total flexibilidad al ligando durante la exploración conformacional. Se activó la opción de GOLD que considera las interacciones de ligandos orgánicos con iones metálicos en metaloenzimas pero limitando dichas interacciones a las que consideran geometrías hexacoordinadas del átomo de hierro. Se empleó el GA más eficiente para asegurar una exploración conformacional extensiva del AA. Para hacer una estimación de las energías de Gibbs de unión de dicho sustrato se utilizó la función *fitness* ChemScore.

En relación con las simulaciones de MD, los diferentes sistemas se montaron utilizando el procedimiento recomendado por el paquete de programas AMBER²⁴⁹. Para los átomos

de proteína se utilizó el *force field* ff14SB²⁵⁰. Los parámetros de *force field* para el AA³²⁵ y el átomo de hierro con su primera esfera de coordinación (His368, His373, His551, Asn555, Ile674 y el grupo OH) se recuperaron de trabajos previos. Se usó la librería GAFF2^{249,251} como fuente para estos parámetros. Por último, el estado de protonación del AA también se estableció a mano para asegurar que éste coincidía con el estado de protonación en condiciones fisiológicas.

Las dos simulaciones de MD realizadas siguieron el mismo protocolo, la única diferencia fue la estructura de partida. Después de combinar los diferentes archivos, los diferentes sistemas se solvataron con una caja ortorrómbica de aguas preequilibradas TIP3P²⁵⁵ y su carga total se neutralizó añadiendo cationes sodio mediante el programa tLeap. Los sistemas resultantes contenían alrededor de 107500 átomos, de los cuales unos 10900 pertenecían a la enzima. Los átomos restantes representan moléculas de agua y cationes sodio. Todas las simulaciones de MD se calcularon con la versión AMBER 20 GPU (CUDA) del paquete de programas PMEMD^{214,256}. En primer lugar, el sistema se sometió a 22000 pasos de minimización de energía utilizando el método *steepest-descent* para evitar malos contactos. En los primeros 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos de proteína y sustrato (en el caso de que esté presente) con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻², de manera que sólo se relajaron el solvente y los iones. En los siguientes 6000 pasos, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos del esqueleto proteico y a los átomos pesados del sustrato (en el caso de que esté presente) con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻². En los últimos 10000 pasos, todo el sistema se mantuvo libre de restricciones. Después de esto, se realizaron simulaciones de MD usando PBC. El sistema se calentó gradualmente de 0 K a 300 K durante un período de 200 ps. A continuación, se ha calculado una simulación de MD de 1 ns a temperatura y presión constantes (300 K, 1 bar) para ajustar el volumen de la caja ortorrómbica de manera que la densidad del sistema alcanzara un valor próximo a 1 g cm⁻³. A lo largo del calentamiento y la etapa isobárica, se aplicaron restricciones armónicas a los átomos del esqueleto proteico y a los átomos pesados del sustrato (en el caso de que esté presente) con una constante de fuerza de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻², mientras que no se aplicó restricción alguna al resto del sistema. La temperatura se controló por medio de dinámica de Langevin²¹⁶, mientras que la presión se ajustó mediante el baróstato de Berendsen²¹⁷. Después, se realizó una etapa de equilibración de 10 ns a temperatura (300 K) y volumen constantes. En último lugar, se calculó un período de producción de 200 ns dentro del mismo colectivo isotérmico-isocórico. A lo largo de toda la trayectoria de MD se empleó un *time step* de 2 fs y se ha realizado el análisis de las simulaciones de MD con AmberTools20²⁴⁹. Todos los enlaces y ángulos que contenía átomos de hidrógeno se restringieron mediante el algoritmo SHAKE²¹⁵. Las interacciones no enlazantes se calcularon empleando un *cutoff* de 9 Å. Se utilizó como estructura de partida para la simulación de MD del sistema h-5-LOX-*empty* la estructura de la 5-LOX humana *wild-type* proveniente de AlphaFold después de haberle aplicado el procedimiento expuesto en el primer párrafo de la presente sección. Dicha simulación de MD tenía el propósito de relajar el sistema h-5-LOX-*empty*. La última estructura de esta simulación de MD se empleó como receptor para el *docking* de AA en la cavidad del sistema h-5-LOX-*empty*. A continuación, la mejor pose de *docking* del AA en dicha cavidad se seleccionó como estructura de partida para la simulación de MD del complejo h-5-LOX-AA.

Por otra parte, se realizaron los cálculos QM/MM utilizando el paquete de programas modular ChemShell^{234,257}. Para los cálculos DFT se usó TURBOMOLE²⁵⁸, mientras que para los cálculos MM se usó el módulo DL_POLY²⁵⁹ de ChemShell empleando el *force field* de AMBER. Para tratar las interacciones electrostáticas entre los subsistemas QM y MM se empleó un esquema de *embedding* electrónico²²⁸. Además, se adoptó un esquema de *link atoms* para describir la frontera QM-MM usando un modelo de desplazamiento de carga²³⁵ y no se emplearon *cutoffs* para tratar las interacciones no enlazantes MM y QM/MM²⁶⁰. Se han realizado las optimizaciones QM/MM empleando el algoritmo *limited-memory Broyden-Fletcher-Goldfard-Shanno* (L-BFGS)^{261,262} para las minimizaciones de energía. Este algoritmo está implementado en la librería DL_FIND de optimización de geometrías de ChemShell²⁶⁷. Se seleccionaron algunas estructuras que parecían adecuadas para experimentar el proceso enzimático que lleva a cabo la 5-LOX de la simulación de MD del complejo h-5-LOX-AA para realizar los cálculos QM/MM. Para cada estructura seleccionada, se eliminaron todas las moléculas de agua que se encontraban fuera de un volumen de 17 Å de radio centrado en la molécula de sustrato. La región activa se definió como todos los residuos y moléculas de agua que se encontraban dentro de una esfera de 15 Å de radio centrada en el C₅ del ligando. A esta región, que contenía alrededor de 2100 átomos, se le permitió moverse libremente, mientras que el resto de átomos permanecieron fijos. En cada cálculo QM/MM se tuvieron en cuenta aproximadamente 12600 átomos. La región QM se describió mediante el funcional híbrido B3LYP²⁶⁹. Para los átomos C, H, O y N se empleó el conjunto de base de People 6-31G(d), mientras que para el átomo de Fe se utilizó el conjunto de base LANL2DZ²⁷⁰. Éste último es un conjunto de base relativamente reducido que combina un *effective core potential* (ECP) con un conjunto de base de valencia de calidad doble zeta. Como norma general, este conjunto de base debe ser usado con precaución, pero se ha comprobado que se puede emplear para describir el átomo de Fe en muchas reacciones de lipoxigenasas con resultados aceptables²⁷¹⁻²⁷⁴. Con respecto a las abstracciones del hidrógeno pro-*S* del C₇, se definió la región QM (ver Figura 87) como todos los átomos del sustrato lipídico que se encuentran entre C₃ y C₁₄, 11 átomos por cada His de la esfera de coordinación del átomo de hierro (His368, His373 y His551), 8 átomos de Asn555 de la esfera de coordinación del átomo de hierro, 3 átomos de la Ile terminal (Ile674) de la esfera de coordinación del átomo de hierro y el cofactor Fe(III)-OH⁻, mientras que para el resto de etapas del proceso enzimático de la h-5-LOX, se ha extendido esta región en una molécula de oxígeno. En todos los casos se usó una multiplicidad de sextete donde la carga neta de la región QM es 1 u.a. Además, se han utilizado siete *link atoms*, cinco de los cuales entre los enlaces C_α-átomo QM de los cinco residuos de la esfera de coordinación del átomo de hierro y los dos restantes se encuentran unidos a los átomos de carbono alifáticos del sustrato lipídico (colocados entre C₃-C₄ y C₁₃-C₁₄).

En último lugar, los canales a través de los cuales puede acceder el oxígeno al interior de la enzima se han buscado utilizando el plugin Caver3.0.3²⁷⁵ de PyMol³¹⁵ donde se ha analizado únicamente la estructura que presentaba una menor barrera de energía potencial para la abstracción del hidrogeno pro-*S* del C₇ de las estructuras que fueron consideradas como adecuadas para experimentar el proceso enzimático que lleva a cabo la 5-LOX. Para el cálculo de dichos canales se escogió como punto de partida el C₅ del AA, que es el átomo de carbono que ha de experimentar la oxigenación, y se seleccionó

el valor por defecto para el resto de parámetros, excepto para el radio de prueba mínimo y el radio deseado, que han sido fijados a un valor de 0.6 Å y 2 Å, respectivamente. Todas las visualizaciones y representaciones se han realizado con los programas VMD²⁷⁶ y UCSF CHIMERA²⁷⁷.

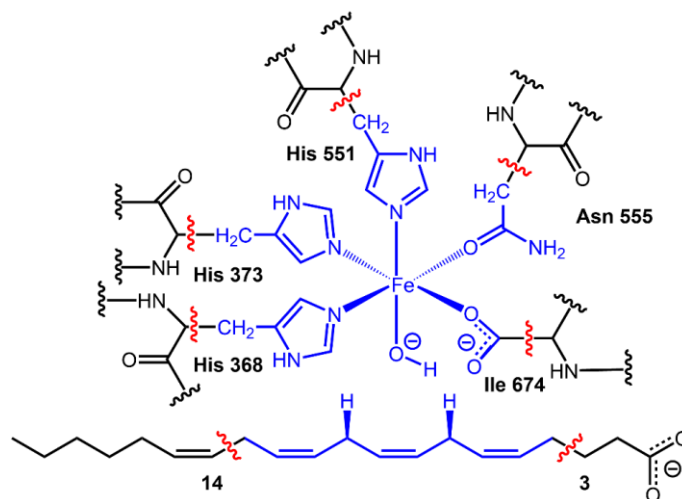


Figura 87. Partición QM/MM para la abstracción de hidrógeno del C₇. Los átomos QM están representados en azul. La frontera entre las regiones QM y MM está indicada por líneas rojas onduladas. Se tiene que añadir una molécula de oxígeno a la región QM para el resto de etapas del proceso enzimático que la h-5-LOX cataliza con el AA como sustrato.

8.3 Resultados

8.3.1 Comparación estructural de h-5-LOX *wild-type* con *human Stable-5-LOX* y simulación de MD de relajación de h-5-LOX *wild-type*

Antes de empezar a realizar cálculos con la estructura de h-5-LOX *wild-type* proporcionada por AlphaFold es útil saber qué diferencias presenta ésta respecto a la estructura de *human Stable-5-LOX*. Se ha escogido como estructura cristalográfica representativa de este mutante solubilizado y estabilizado la estructura correspondiente al *PDB code* 3OY8⁴⁰. Debido a que la estructura proporcionada por AlphaFold para la h-5-LOX *wild-type* es monomérica, únicamente se ha empleado el monómero A de la estructura correspondiente al *PDB code* 3OY8 para llevar a cabo la comparación entre la estructura de h-5-LOX *wild-type* y la estructura de *human Stable-5-LOX*. Si se superponen ambas estructuras (ver Figura 88), se puede apreciar que éstas son muy similares entre sí donde la diferencia más notable se encontraría en el dominio N-terminal, ya que dicho dominio de la estructura de *human Stable-5-LOX* contiene una lámina β adicional, que ayudaría a la cristalización de este mutante, respecto del mismo dominio de la estructura de h-5-LOX *wild-type*. En relación con el dominio C-terminal, se puede apreciar que éste es prácticamente idéntico para ambas estructuras, incluyendo las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 8$ que exhiben una estructura terciaria particular que es característica únicamente

de la isoforma 5-LOX, donde una diferencia interesante entre ambas sería la disposición espacial y conformacional de los residuos Val672, Ala673 y Ile674. Esta sutil diferencia hace que en el caso de h-5-LOX *wild-type*, la Ile674 terminal no pueda coordinarse al átomo de hierro que es responsable de la catálisis enzimática, cosa que justifica el procedimiento empleado para dicha estructura (ver sección 8.2). Es importante notar que la forma de la cavidad de ambas estructuras es muy similar entre sí y esto se debe a la gran similitud existente entre ambos dominios C-terminales.

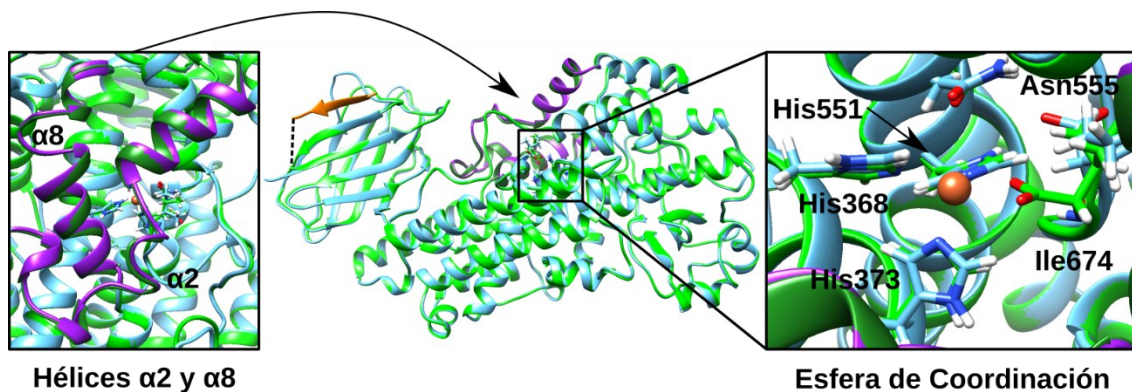


Figura 88. Superposición de las estructuras de h-5-LOX *wild-type* proporcionada por AlphaFold (en azul) y *human Stable-5-LOX* (PDB code 3OY8)⁴⁰ (en verde). La lámina β adicional de *human Stable-5-LOX* está representada en naranja, sin embargo, dicha estructura carece del bucle que une esta lámina β con el resto del dominio N-terminal y la unión de estas dos regiones ha sido indicada con una línea negra discontinua. Para una mayor visibilidad, en el panel de la izquierda se han representado desde otra perspectiva las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 8$, las cuales están indicadas en lila para h-5-LOX *wild-type* y en verde oscuro para *human Stable-5-LOX*. Por otra parte, el panel de la derecha contiene una imagen ampliada de la esfera de coordinación del Fe de ambas estructuras donde se puede apreciar que Ile674 terminal de h-5-LOX *wild-type* no puede coordinarse a dicho átomo de Fe, mientras que el mismo residuo de *human Stable-5-LOX* sí.

A lo largo de la simulación de MD de relajación del complejo h-5-LOX-*empty wild-type*, se ha podido apreciar como la h-5-LOX *wild-type* respiraba y se adaptaba a encontrarse solvatada. En relación con la región que contiene tres lisinas consecutivas (residuos 654-656), las cuales se encuentran en el último giro de la hélice α que precede al grupo carboxilato de la Ile674 terminal, se puede apreciar que Lys654 y Lys655 compiten por formar puentes de hidrógeno con el grupo carboxilato de la cadena lateral de Glu651 (ver Figura 89) a lo largo de dicha simulación de MD. Cuando el grupo NH_3^+ de la cadena lateral de Lys654 forma un puente de hidrógeno con el grupo carboxilato de la cadena lateral de Glu651 (panel A de la Figura 89), el último giro de dicha hélice α terminal se encuentra ligeramente deformado, mientras que cuando el grupo NH_3^+ de la cadena lateral de Lys655 forma puentes de hidrógeno con el grupo carboxilato de la cadena lateral de Glu651 (panel B de la Figura 89), el último giro de esta hélice α tiene una forma bien definida. Mayoritariamente Lys654 es quien coordina con el grupo carboxilato de la cadena lateral de Glu651, mientras que Lys655 queda apuntando hacia el solvente. Por lo tanto, el último giro de la hélice α terminal se encontrará ligeramente deformado la

mayor parte del tiempo. Por otra parte, cabe destacar que esta transición entre estas dos conformaciones de Lys654 y Lys655 genera una vibración que se propaga por ambos extremos de la hélice α terminal que contiene estas tres lisinas consecutivas. De hecho, se puede apreciar como al producirse dicho cambio conformacional la distancia entre el átomo de oxígeno del grupo carboxilato de la Ile674 terminal que se encuentra coordinado al átomo de hierro y dicho átomo varía (cuando Lys654 ocupa el grupo carboxilato de la cadena lateral de Glu651, esta distancia es de 2.00 Å, mientras que cuando Lys655 lo ocupa, esta distancia es de 2.16 Å). Así pues, no es descabellado pensar que el cambio conformacional que pueden experimentar estas lisinas genere cambios conformacionales adicionales en el centro activo que puedan afectar al proceso enzimático de h-5-LOX. La confirmación de dicha hipótesis sugeriría que estas tres lisinas consecutivas pueden modular la actividad enzimática de h-5-LOX. Por último, Lys656 permanece formando puentes de hidrógeno con el átomo de oxígeno del esqueleto de Arg652. Estas tres lisinas son precisamente las que se mutan en *human Stable-5-LOX* (PDB code 3OY8)⁴⁰ con el objetivo de aportar estabilidad a dicha enzima con el fin de hacer posible su cristalización. Nuestros resultados de simulación de MD sugieren la razón por la cual la mutación de estas tres lisinas permite la cristalización de la 5-LOX.

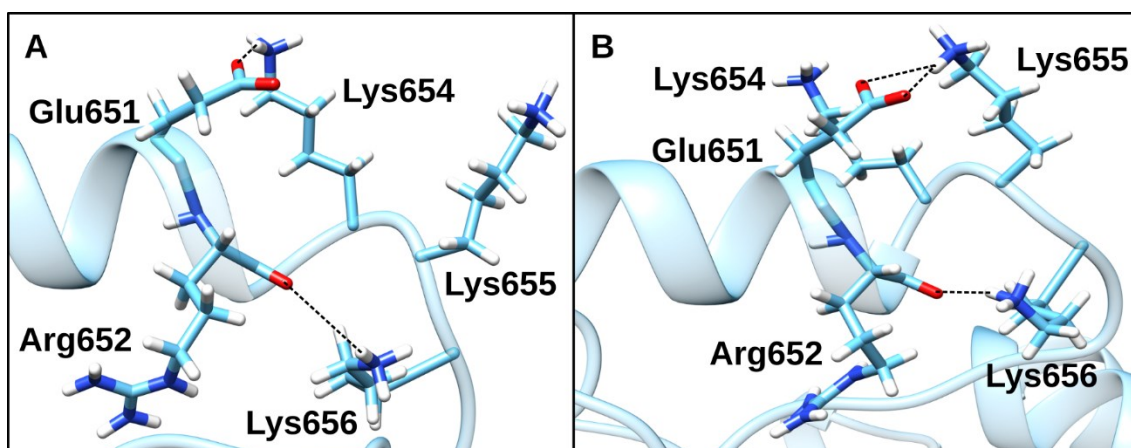


Figura 89. Representación de las dos conformaciones que exhiben Lys654 y Lys655 de la hélice α terminal. En el panel A, está representada la conformación donde Lys654 conecta con el grupo carboxilato de la cadena lateral de Glu651, mientras que en el panel B, está representada la conformación donde Lys655 coordina con el grupo carboxilato de la cadena lateral de Glu651. Además, en dichos paneles también se ha representado la interacción entre Arg652 y Lys656. Los puentes de hidrógeno están indicados con líneas negras discontinuas.

8.3.2 Cálculos de *docking* de AA

Los cálculos de *docking* de AA dentro de la cavidad de h-5-LOX *wild-type* después de que dicha enzima haya sido relajada han producido 6 clústeres, donde el mejor de los cuales es el más poblado. Antes de comenzar a analizar los clústeres obtenidos con los cálculos de *docking*, es preciso remarcar que basándose en los datos cristalográficos disponibles de la 5-LOX, se han propuesto dos hipótesis para explicar el acceso del sustrato al interior

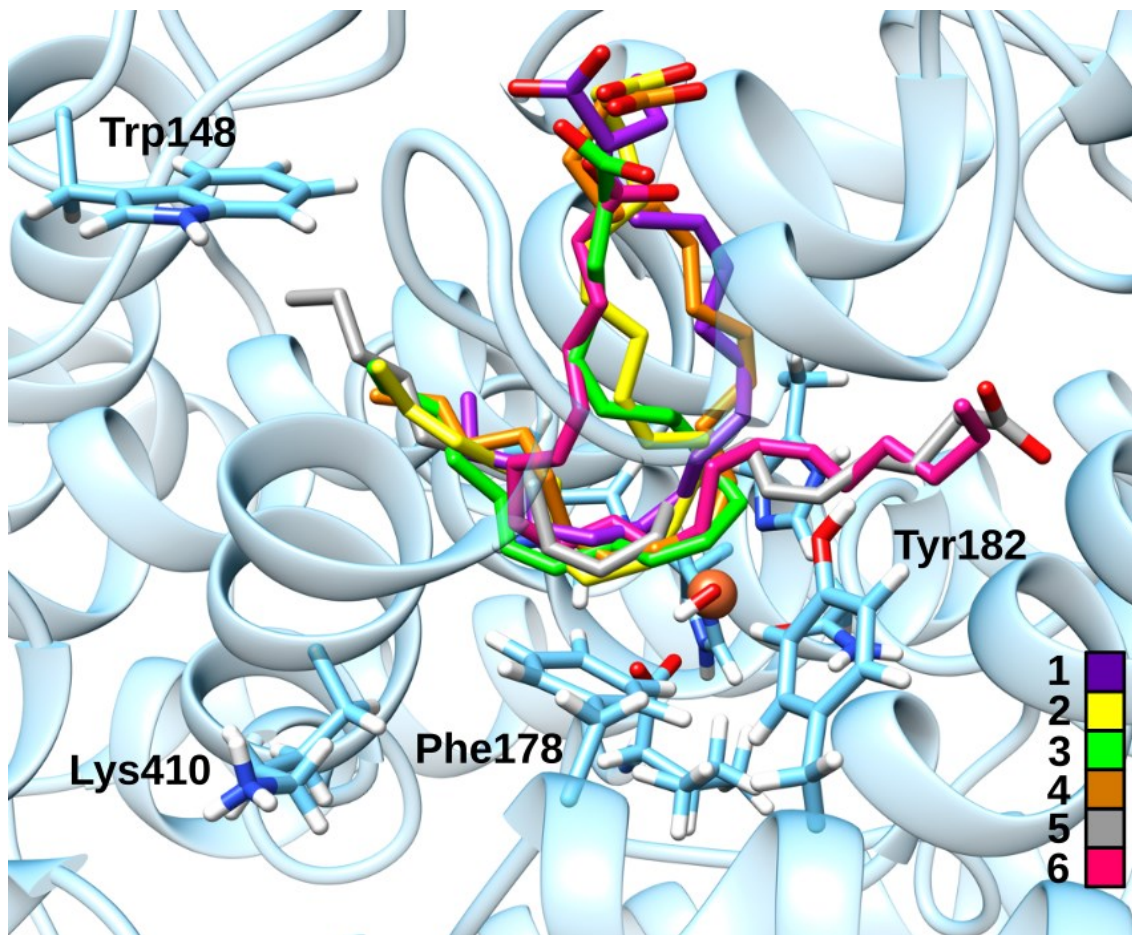


Figura 90. Representación de la mejor solución de los diferentes clústeres obtenidos con los cálculos de *docking* de AA en el interior de la cavidad de h-5-LOX *wild-type*. Por claridad, no se han indicado los átomos de hidrógeno de dichas soluciones. Se han representado la esfera de coordinación del Fe y los residuos Trp148, Phe178, Tyr182 y Lys410 con el objetivo de poder situar en el centro activo de h-5-LOX *wild-type* las diferentes soluciones representadas.

de su cavidad: 1) dicho sustrato accede a través del par de residuos Phe178 y Tyr182, el cual recibe el nombre de *FY-cork*; 2) dicho sustrato accede a través de Trp148, el cual se encuentra en el lado opuesto a *FY-cork* (ver Figura 90)⁴⁰. En la presente tesis no se va a discutir como entra el sustrato al interior de la cavidad de 5-LOX, pero sí como se coloca dicho sustrato una vez ha entrado. A partir de este punto, la orientación *head/tail-first* se referirá a la posición relativa del grupo carboxilato del AA respecto a Lys410, la cual se supone que tiene un papel similar a Arg403 y Arg599 en la 15-LOX-1 de conejo respecto a la fijación del sustrato^{38,39,356,376,377}, de tal manera que la orientación *tail-first* significa que el grupo carboxilato del AA está dirigido hacia el extremo de la cavidad donde se encuentra Lys410, mientras que *head-first* significa una orientación opuesta a la que se acaba de comentar. Después de esto, los clústeres obtenidos con los cálculos de *docking* de AA en el interior de la cavidad de h-5-LOX *wild-type* (Figura 90) se podrían clasificar en dos categorías, es decir, clústeres donde el grupo carboxilato de AA se encuentra en el mismo lado de Trp148 y clústeres donde esto no sucede. De esta primera categoría forman parte el primer, el segundo, el tercer, el cuarto y el sexto clúster, mientras que la segunda

categoría está constituida únicamente por el quinto mejor clúster. Es importante notar que todas las soluciones que pertenecen a esta primera categoría presentan dos importantes inconvenientes: 1) el grupo carboxilato del AA no está sujeto por ningún puente de hidrógeno fuerte, cosa que sugiere que la pose del AA no es muy estable y va a presentar una gran flexibilidad; 2) sus distancias de C₇, C₁₀ y C₁₃ respecto al átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻, indicadas como d(C₇-OH), d(C₁₀-OH) y d(C₁₃-OH), respectivamente, no son compatibles con la reactividad que exhibe 5-LOX para el AA (ver Tabla 22). En cambio, en relación con el clúster que constituye la segunda categoría, su mejor solución (Figura 91) presenta unas distancias d(C₇-OH), d(C₁₀-OH) y d(C₁₃-OH) que sí son compatibles con la reactividad que exhibe 5-LOX para el AA. Además, el grupo carboxilato para esta solución, el cual presenta una orientación *head-first*, se encuentra bien anclado, ya que uno de sus átomos de oxígeno forma un puente de hidrógeno con el grupo NH₂ de la cadena lateral de Asn426, mientras que el otro forma un puente de hidrógeno, algo menos fuerte que el anterior, con el grupo NH del esqueleto de Val 605 e interacciona electrostáticamente de manera favorable con His601. Es necesario subrayar que se va a emplear la mejor solución del clúster que constituye esta segunda categoría para iniciar la simulación de MD del complejo h-5-LOX-AA debido a que este clúster es el único obtenido que es compatible con la reactividad que exhibe 5-LOX para el AA. Por último, cabe destacar que ninguna de las soluciones de *docking* del AA dentro de la cavidad de h-5-LOX *wild-type* ancla el grupo carboxilato de este sustrato a Lys410, lo cual parece confirmar que la entrada del AA es *head-first*.

Tabla 22. Distancias de C₇, C₁₀ y C₁₃ del AA respecto del átomo de oxígeno del grupo OH⁻ del cofactor Fe(III)-OH⁻ para la mejor solución de los 6 clústeres obtenidos de los cálculos de *docking* del AA en el interior de la cavidad de h-5-LOX *wild-type*.

Clúster	d(C ₇ -OH) (Å)	d(C ₁₀ -OH) (Å)	d(C ₁₃ -OH) (Å)
1	10.17	7.21	4.21
2	7.66	4.64	3.10
3	5.85	3.12	3.17
4	7.77	4.58	3.34
5	4.23	3.30	5.54
6	6.47	3.29	4.37

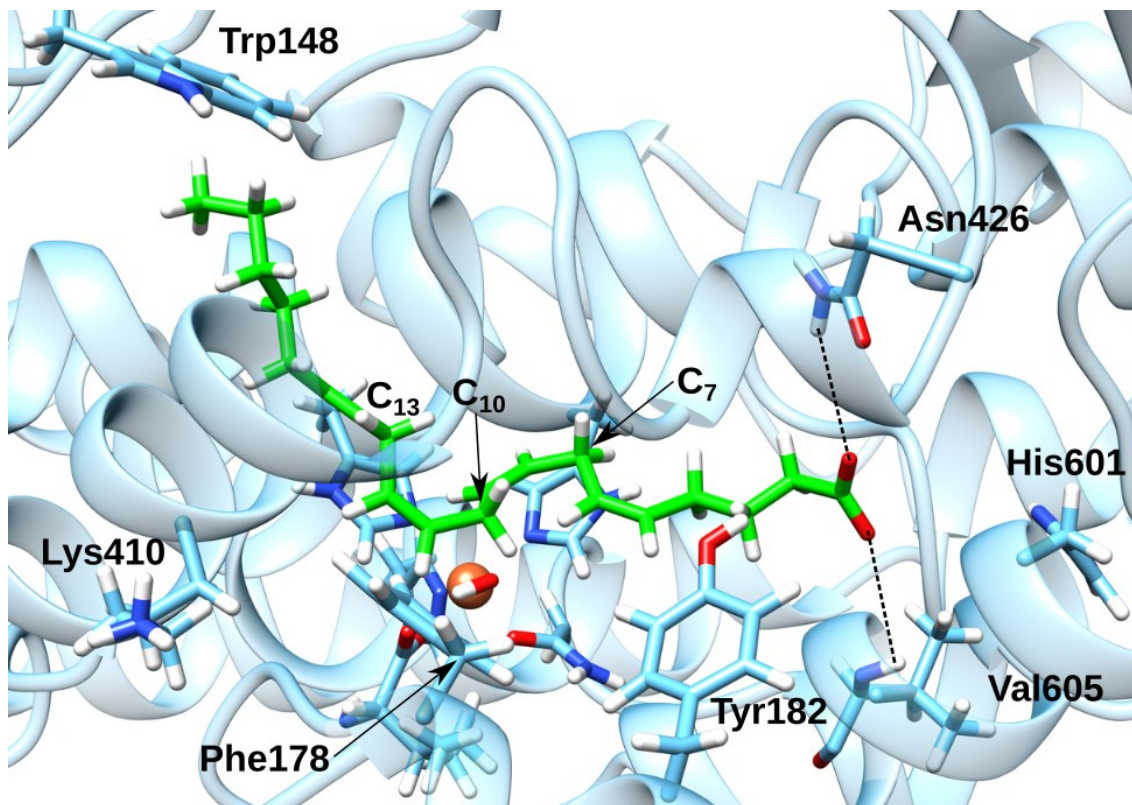


Figura 91. Representación de la mejor solución del único clúster (quinto mejor) que presenta unas distancias $d(C_7-OH)$, $d(C_{10}-OH)$ y $d(C_{13}-OH)$ que son compatibles con la reactividad que exhibe h-5-LOX *wild-type* para el AA. Se han indicado los átomos de carbono C_7 , C_{10} y C_{13} y los residuos que interaccionan más intensamente con el AA. Además, se han representado la esfera de coordinación del Fe y los residuos Trp148, Phe178, Tyr182 y Lys410 con el objetivo de poder situar en el centro activo de la h-5-LOX *wild-type* la solución representada con mayor facilidad. Los puentes de hidrógeno están indicados con líneas negras discontinuas.

8.3.3 Simulación de MD del complejo h-5-LOX-AA

Se ha realizado una simulación de MD de 200 ns del complejo de Michaelis h-5-LOX-AA donde se ha empleado la mejor solución del quinto mejor clúster de los cálculos de *docking* del AA en el interior de la cavidad de la h-5-LOX *wild-type* (ver sección 8.3.2 para la explicación de esta elección). En la etapa de equilibración, se puede apreciar que el AA se reorganiza colocando el C_7 enfocado hacia el grupo OH del cofactor Fe(III)-OH⁻ con uno de sus hidrógenos bien orientado para la abstracción de éste, mientras que C_{10} y C_{13} se desplazan, alejándose de dicho cofactor, cosa que dificulta la abstracción de hidrógeno de estos átomos de carbono. Por otra parte, dentro de la etapa de producción se podría distinguir dos períodos, uno de estabilización y otro de consolidación. Durante el período de estabilización, el grupo carboxilato y los primeros átomos de carbono del AA presentan una gran movilidad, aunque la región del AA donde se encuentran C_7 , C_{10} y C_{13} , los átomos de carbono que son relevantes desde un punto de vista de la reactividad, permanece bastante más rígida. Dicho período se extiende durante los primeros 49 ns de la etapa de producción y a lo largo de éste, el grupo carboxilato del AA interacciona con

un gran número de residuos, donde los más destacados serían Tyr182, Gln364, Thr365, His368, Asn426, Thr428 y Gln558, ya sea formando puentes de hidrógeno o estableciendo interacciones electrostáticas. Como norma general, estas interacciones son bastante débiles y de corta duración, aunque a veces pueden llegar a ser muy intensas. En cambio, durante el período de consolidación (ver Figura 92), la conformación del AA es relativamente rígida y no experimenta fluctuaciones bruscas. Todo esto es debido a que a lo largo de este período el grupo carboxilato del AA se encuentra sujeto por la formación de puentes de hidrógeno con la triada Tyr182 (con el grupo OH de su cadena lateral), Gln364 (con el grupo NH₂ de su cadena lateral) y Asn426 (con el grupo NH₂ de su cadena lateral), siendo el segundo de los residuos enumerados el que más contribuye a dicha sujeción.

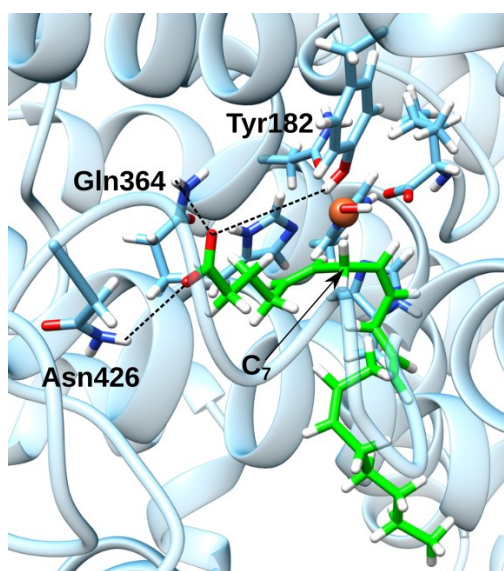


Figura 92. Representación del modo de unión del AA en el centro activo de la h-5-LOX *wild-type* durante el período de consolidación de la simulación de MD del complejo de Michaelis h-5-LOX-AA. Se han indicado los residuos que fijan el grupo carboxilato del AA y su átomo de carbono C₇, el cual ha de experimentar la abstracción de hidrógeno en primer lugar.

Por otra parte, para que el proceso enzimático de la 5-LOX sobre el AA, el cual consiste en una hidropoxidación seguida de una epoxidación, pueda evolucionar hasta el producto final LTA₄, es necesario que primero se produzca la abstracción de H_{7proS}, para que pueda tener lugar la hidropoxidación inicial, y que posteriormente se produzca la abstracción de H_{10proR}, para que pueda tener lugar la epoxidación final (Figura 93). Por lo tanto, vale la pena analizar la evolución de las distancias de C₇, C₁₀, C₁₃ y los átomos de hidrógeno unidos a los dos primeros átomos de carbono con el átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ a lo largo de la simulación de MD del complejo h-5-LOX-AA. Con respecto a las distancias d(C₇-OH), d(C₁₀-OH) y d(C₁₃-OH) (ver Figura 94), se puede apreciar que el C₇ se encuentra más cerca del átomo de oxígeno aceptor de hidrógeno que el C₁₀, mientras que el C₁₃ se encuentra sustancialmente más lejos que éstos. Las distancias promedio d(C₇-OH), d(C₁₀-OH) y d(C₁₃-OH) (Tabla 23) también reflejan este hecho. En base a un criterio de distancias, se puede concluir que tanto la abstracción de

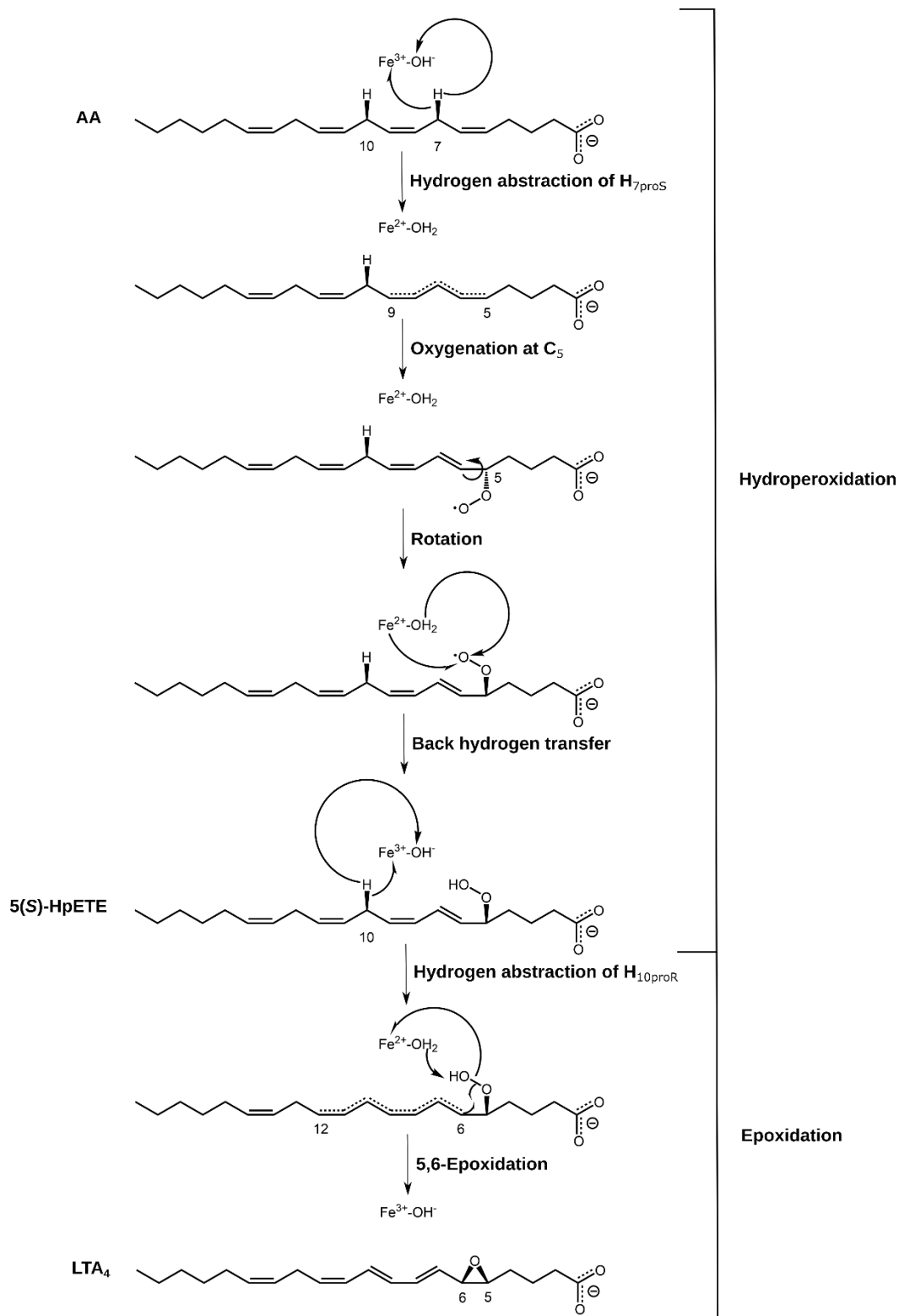


Figura 93. Mecanismo tentativo de reacción de la hidropoxidación y la epoxidación catalizadas por la h-5-LOX *wild-type* cuando AA actúa como sustrato. La etapa de hidropoxidación se desarrolla tras la abstracción inicial de H_{7proS} del C_7 generando como producto final 5(*S*)-HpETE, mientras que la etapa de epoxidación se desarrolla tras la abstracción de H_{10proR} del C_{10} generando como producto final LTA_4 ³⁷⁸. La disposición antarafacial de la hidropoxidación es bien conocida³⁷⁹⁻³⁸¹, sin embargo, Jin *et al.*²⁷⁸ han postulado una disposición suprafacial para la epoxidación.

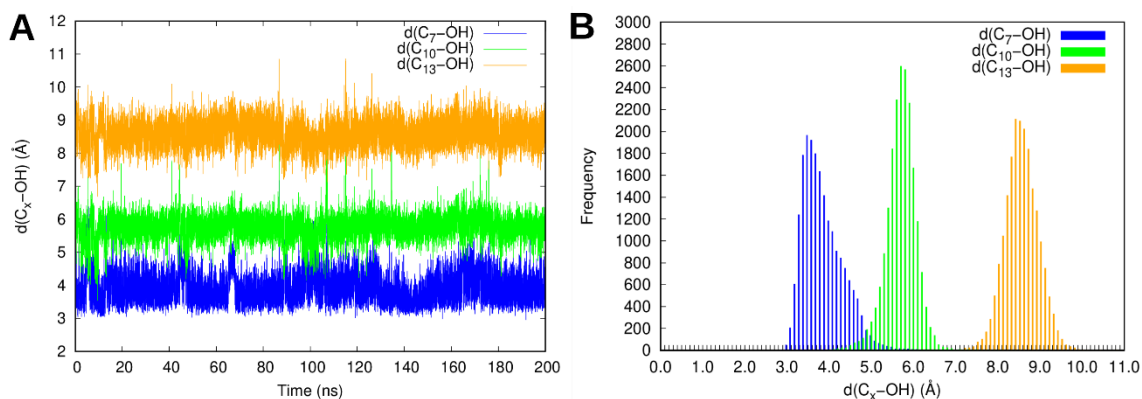


Figura 94. Representación en función del tiempo e histograma de las distancias $d(C_7\text{-OH})$ (en azul), $d(C_{10}\text{-OH})$ (en verde) y $d(C_{13}\text{-OH})$ (en naranja) correspondientes a la simulación de MD de 200 ns del complejo de Michaelis h-5-LOX-AA. OH indica el grupo OH⁻ del cofactor Fe(III)-OH⁻ de la h-5-LOX.

Tabla 23. Promedio y desviación estándar de las distancias de interés desde un punto de vista de reactividad de la h-5-LOX correspondientes a la simulación de MD de 200 ns del complejo de Michaelis h-5-LOX-AA. No se han considerado los átomos de hidrógeno del C₁₃ dado que este átomo de carbono se encuentra, en promedio, demasiado lejos del átomo de oxígeno aceptor de protón como para poder experimentar ninguna abstracción de hidrógeno.

Distancia considerada	Promedio y desviación estándar (en Å)
$d(C_7\text{-OH})$	3.92 ± 0.48
$d(H_{7\text{proS}}\text{-OH})$	3.58 ± 0.78
$d(H_{7\text{proR}}\text{-OH})$	4.82 ± 0.62
$d(C_{10}\text{-OH})$	5.76 ± 0.37
$d(H_{10\text{proS}}\text{-OH})$	5.49 ± 0.45
$d(H_{10\text{proR}}\text{-OH})$	5.94 ± 0.45
$d(C_{13}\text{-OH})$	8.59 ± 0.39

hidrógeno del C₇ como la del C₁₀ son viables, mientras que la del C₁₃ no lo sería. Además, la abstracción de hidrógeno del C₇ estaría favorecida en relación con la del C₁₀. Todo esto está de acuerdo con la reactividad que exhibe h-5-LOX respecto al AA, ya que la abstracción de hidrógeno del C₁₃ no debe producirse, mientras que la abstracción de hidrógeno del C₇ debe tener lugar antes que la del C₁₀. Es importante notar que existe un grupo de estructuras, minoritario pero no despreciable, en que el C₇ y el C₁₀ se encuentran prácticamente equidistantes respecto del átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻. Este grupo es candidato a poder experimentar abstracciones de hidrógeno en ambos átomos de carbono. Sin embargo, teniendo en cuenta los átomos de hidrógeno que han de abstraerse para que el producto final resultante de la catálisis enzimática de h-5-LOX sobre el AA tenga la estereoquímica correcta, no sólo es necesario que primero se produzca una abstracción de hidrógeno en el C₇ y posteriormente otra en el C₁₀, sino que también es necesario que el átomo de hidrógeno abstraído para el C₇ sea el pro-*S*

($H_{7\text{proS}}$) y que el átomo de hidrógeno abstraído para el C_{10} sea el pro- R ($H_{10\text{proR}}$)³⁷⁸. Respecto a los átomos de hidrógeno unidos al C_7 (ver gráfico A de la Figura 95 y Tabla 23), se puede apreciar que durante casi toda la simulación de MD el $H_{7\text{proS}}$ se encuentra mucho más próximo al átomo de oxígeno aceptor de hidrógeno que $H_{7\text{proR}}$. Este resultado también se ve reflejado en las distancias promedio $d(H_{7\text{proS-OH}})$ y $d(H_{7\text{proR-OH}})$. En cambio, respecto a los átomos de hidrógeno unidos al C_{10} (ver gráfico B de la Figura 95 y Tabla 23), se tiene una situación ligeramente diferente. En este caso, ambos átomos de hidrógeno del C_{10} se encuentran prácticamente a la misma distancia del átomo de oxígeno del cofactor $Fe(III)\text{-OH}^-$, aunque el $H_{10\text{proS}}$ se encuentra ligeramente más próximo respecto dicho átomo de oxígeno. Otra vez, este resultado también se ve reflejado en las distancias promedio $d(H_{10\text{proS-OH}})$ y $d(H_{10\text{proR-OH}})$. Así pues, tanto la abstracción de $H_{7\text{proS}}$ como de $H_{10\text{proR}}$ serían factibles. Considerándolo todo, se puede concluir que los resultados obtenidos para la simulación de MD del complejo h-5-LOX-AA son compatibles con la reactividad que exhibe dicha enzima en relación con este sustrato. En último lugar, si se considera como estructura precatalítica aquella que es capaz de experimentar tanto la abstracción de $H_{7\text{proS}}$ como de $H_{10\text{proR}}$, un posible filtro para identificarlas sería que se cumpliesen las siguientes dos condiciones simultáneamente: 1) $d(H_{7\text{proS-OH}}) \leq 3.0 \text{ \AA}$ y $d(H_{7\text{proS-OH}}) < d(C_7\text{-OH})$; 2) $d(H_{10\text{proR-OH}}) \leq 5.0 \text{ \AA}$ y $d(H_{10\text{proR-OH}}) < d(C_{10}\text{-OH})$. Cabe destacar que para la abstracción de hidrógeno del C_{10} se impone una condición menos severa que para la del C_7 ya que, como se ha dicho más arriba, el C_7 se encuentra más cerca del átomo de oxígeno aceptor de hidrógeno que el C_{10} y que a lo largo de la hidroperoxidación, primera reacción del proceso enzimático de la 5-LOX, se pueden producir pequeños movimientos del AA que acerquen al C_{10} al átomo de oxígeno aceptor de hidrógeno. Aplicando dicho filtro, se ha obtenido un total de 61 estructuras, de las cuales 3 han sido seleccionadas para intentar llevar a cabo la abstracción de $H_{7\text{proS}}$, que representa un 0.31 % de todas las estructuras de la simulación de MD. Esta pequeña generación de estructuras precatalíticas es congruente con el hecho de que la 5-LOX es una de las isoformas más lentas de la familia de las LOXs.

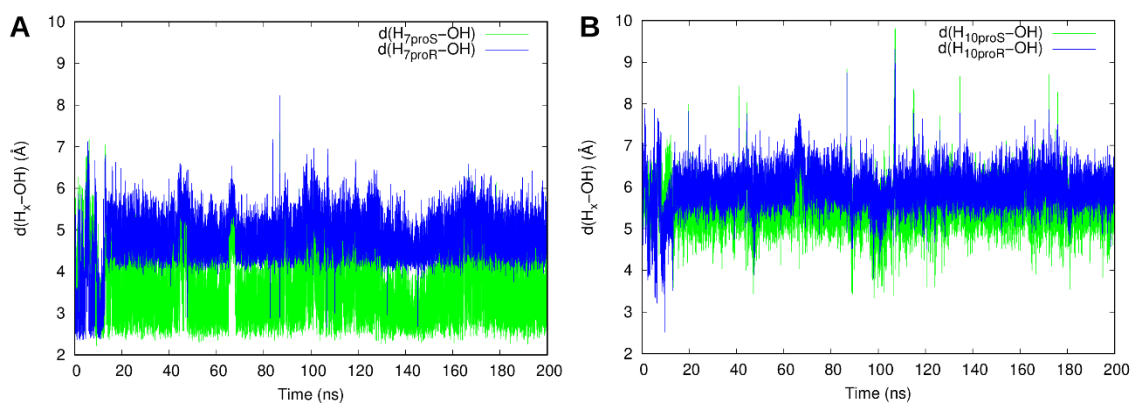


Figura 95. Distancia en función del tiempo de los átomos de hidrógeno pro- S (en verde) y pro- R (en azul) (en \AA) de los átomos de carbono C_7 (gráfico A) y C_{10} (gráfico B) respecto del átomo de oxígeno del grupo OH^- del cofactor $Fe(III)\text{-OH}^-$ para la simulación de MD de 200 ns del complejo de Michaelis h-5-LOX-AA. OH indica el grupo OH^- del cofactor $Fe(III)\text{-OH}^-$ de la h-5-LOX.

8.3.4 Cálculos QM/MM

Por claridad, se muestra la totalidad del proceso enzimático que teóricamente la h-5-LOX cataliza sobre el AA (Figura 93). A lo largo de la presente sección se van a exponer los resultados obtenidos para las diferentes etapas estudiadas de dicho proceso enzimático.

8.3.4.1 Abstracción de H_{7proS} del C₇ del AA

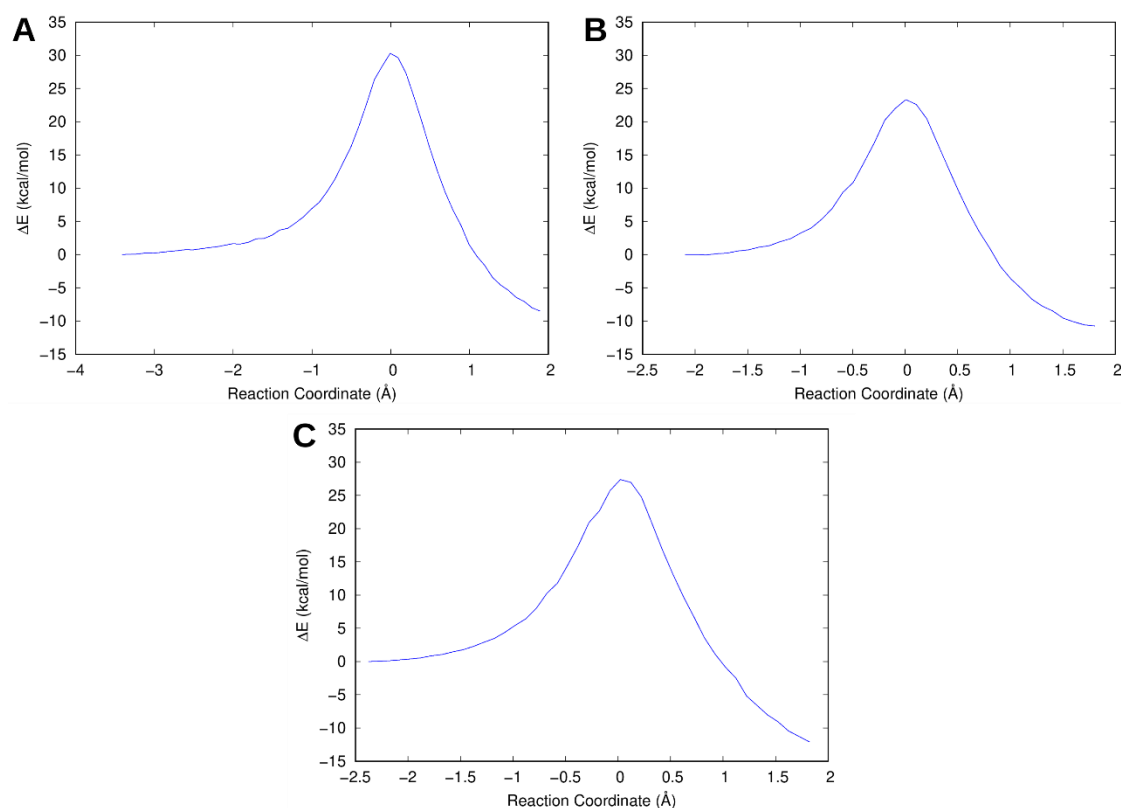


Figura 96. Perfiles de energía potencial de la abstracción de H_{7proS} del C₇ del AA correspondientes a los *snapshots* 914 (panel A), 15204 (panel B) y 19833 (panel C).

Se han escogido aleatoriamente tres estructuras precatalíticas (ver sección 8.3.3) de la simulación de MD del complejo h-5-LOX-AA para intentar llevar a cabo la abstracción de H_{7proS} del C₇. En cada caso, se seleccionó el átomo de hidrógeno del C₇ que se encontraba más próximo al átomo de oxígeno aceptor de protón para ser abstraído, el cual resultó ser siempre el H_{7proS}. Aunque el filtro empleado para seleccionar las estructuras precatalíticas no asegura que H_{7proS} sea el átomo de hidrógeno más próximo al átomo de oxígeno del cofactor Fe(III)-OH⁻, sí que asegura que el H_{7proS} esté bien orientado para la abstracción de hidrógeno. Entonces, como es muy poco frecuente que para una estructura dada ambos átomos de hidrógeno estén bien orientados para su abstracción, esta condición de orientación para el H_{7proS} induce que éste sea el átomo de hidrógeno del C₇ más próximo respecto del átomo de oxígeno aceptor de protón. Tomando como punto de partida la geometría optimizada correspondiente a cada estructura precatalítica seleccionada, se ha calculado el correspondiente perfil de energía potencial

en función de la coordenada de reacción (Figura 96). Dicha coordenada de reacción se ha definido como la diferencia entre la longitud del enlace que se rompe (C_7-H_{7proS}) y la longitud del enlace que se forma ($H_{7proS}-O$). Cabe destacar que para los diferentes perfiles calculados a lo largo de la sección 8.3.4, las estructuras de estado de transición se aproximaron a los puntos de máxima energía obtenidos, mientras que las estructuras de reactivo y producto son los correspondientes mínimos absolutos de energía. En los paneles A, B y C de la Figura 97 aparecen las estructuras correspondientes al *snapshot* 15204 de reactivo, TS y producto, respectivamente. Las barreras de energía potencial resultantes para las tres estructuras precatalíticas escogidas oscilaron entre 23.3 kcal/mol y 30.3 kcal/mol (ver Tabla 24). Además, la energía de reacción de las tres estructuras precatalíticas seleccionadas correspondiente a la abstracción de H_{7proS} resultó ser bastante exoérgica (en el menor de los casos unas -11 kcal/mol, ver Tabla 24). Es significativo subrayar que aunque pueda parecer que estas barreras exhiben una dispersión muy grande, se han obtenido dispersiones de barreras aún mayores para reacciones comparables a la que se está estudiando en la presente sección, como son las abstracciones de H_{7proS} y H_{13proS} del AA catalizadas por la 15-LOX-1 de conejo³⁸². Estas abstracciones que se acaban de comentar son comparables a la abstracción de H_{7proS} del C_7 , ya que en todas ellas se abstrae un átomo de hidrógeno de una unidad 1,4-*Z,Z*-pentadieno dando lugar a un radical deslocalizado de cinco átomos de carbono π -pentadienilo. Por otra parte, analizando las diferentes estructuras obtenidas para los perfiles realizados, se puede apreciar que el producto de abstracción levemente desestabilizado respecto a los demás correspondiente al *snapshot* 914 (ver Tabla 24) se debe a que en este *snapshot* la abstracción de hidrógeno H_{7proS} no está acoplada a la formación del radical deslocalizado π -pentadienilo plano, mientras que en los otros *snapshots* sí (ver paneles C y D de la Figura 97). En último lugar, es interesante comparar los valores obtenidos para la barrera de energía potencial correspondiente a la abstracción de H_{7proS} del C_7 catalizada por la h-5-LOX con la barrera de energía potencial promedio exponencial calculada para la abstracción de H_{13proS} del C_{13} del AA catalizada por la 15-LOX-1 de conejo, la cual tiene un valor de 14.6 kcal/mol³⁸². Las barreras de energía potencial de la abstracción de H_{7proS} catalizada por la 5-LOX son notablemente más elevadas que las de la abstracción de H_{13proS} catalizada por la 15-LOX-1³⁸², cosa que está de acuerdo con los datos cinéticos experimentales^{383,384}.

Tabla 24. Barreras de energía potencial y energías de reacción para la abstracción de H_{7proS} de los diferentes *snapshots* seleccionados.

<i>Snapshot</i> considerado	ΔE^\ddagger (kcal/mol)	Energía de reacción (kcal/mol)
914	30.3	-10.9
15204	23.3	-12.7
19833	27.4	-15.8

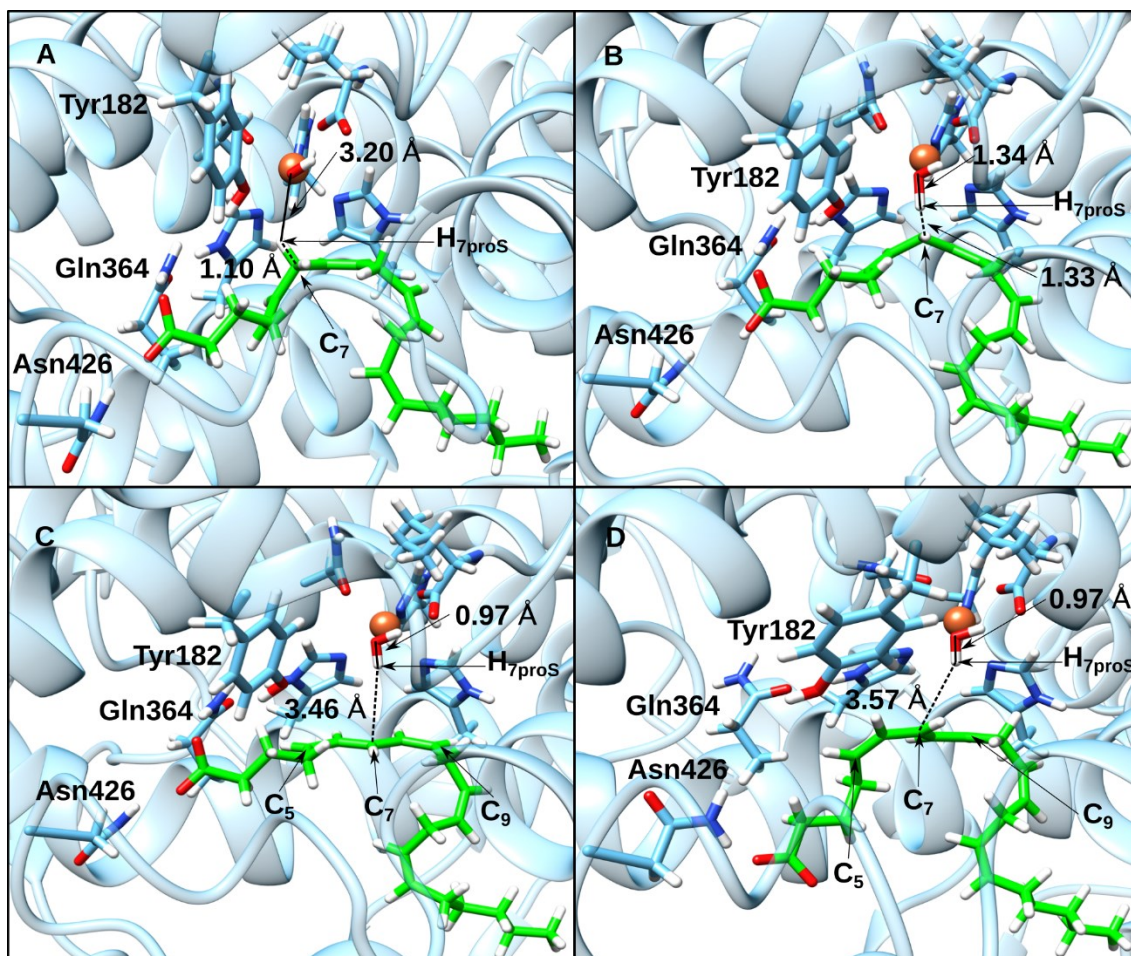


Figura 97. Estructuras de reactivo, TS y producto para la abstracción de $H_{7\text{proS}}$ del *snapshot* 15204 (paneles A, B y C, respectivamente) y estructura de producto para la abstracción de $H_{7\text{proS}}$ del *snapshot* 914 (panel D). Se puede apreciar que para la estructura de producto correspondiente al *snapshot* 15204 (panel C) se forma un radical π -pentadienilo deslocalizado plano, mientras que para la estructura de producto correspondiente al *snapshot* 914 (panel D) no. Este hecho explica la energía de reacción menos negativa obtenida para el último *snapshot* mencionado.

8.3.4.2 Oxigenación del radical π -pentadienilo formado

8.3.4.2.1 Búsqueda de los canales de acceso de la molécula de oxígeno

Una vez estudiada la abstracción de $H_{7\text{proS}}$ del C_7 , se va a estudiar la oxigenación que involucra la adición de una molécula de oxígeno a C_5 o a C_9 . Un paso previo necesario para el estudio de la adición de la molécula de oxígeno al radical π -pentadienilo obtenido tras la abstracción de $H_{7\text{proS}}$ del AA es determinar los canales a través de los cuales la molécula de oxígeno puede acceder al centro activo de la h-5-LOX desde la superficie de ésta. Dichos canales han sido calculados para el producto de la etapa de abstracción de $H_{7\text{proS}}$ correspondiente al *snapshot* 15204, el cual presenta la barrera de energía potencial menor para este proceso de las estructuras precatalíticas estudiadas y un radical π -pentadienilo totalmente plano donde existe deslocalización electrónica entre C_5 y C_9 . Los

canales calculados se han agrupado en dos clústeres (Figura 98) donde la porción más interna respecto de la superficie de la enzima de los túneles representantes para ambos clústeres coincide. Por lo tanto, se tendrían dos puntos de acceso al interior de la proteína no equivalentes entre sí cuyos caminos convergen cuando éstos se acercan a la cavidad donde se aloja el sustrato. Cabe destacar que los dos clústeres de túneles obtenidos conducen exclusivamente al C₅, lo cual es interesante porque en principio la adición de oxígeno podría tener lugar tanto en C₅ como en C₉. Además, el diámetro del túnel representante de ambos clústeres se estrecha a medida que éste se acerca al centro activo de la enzima. De hecho, en la zona más superficial de ambos túneles representantes, el diámetro es suficiente como para albergar tanto a la molécula de oxígeno que se va a adicionar como a diversas moléculas de agua. Los túneles del mejor clúster vendrían definidos por las cadenas laterales de Trp148, Phe152, Thr365, Leu369, Ile416, Phe422 y Val437, además de por el extremo hidrofóbico del AA, mientras que los túneles del segundo mejor clúster vendrían definidos por las cadenas laterales de Phe152, Ile293, Thr365, Leu369, Phe422, Thr428, His433, Val434, Gln435, Met436 y Val437. Es preciso destacar que una proporción importante de residuos coinciden para ambos clústeres, cosa que es debida a que éstos comparten la porción más interna de sus túneles respecto de la superficie de la enzima.

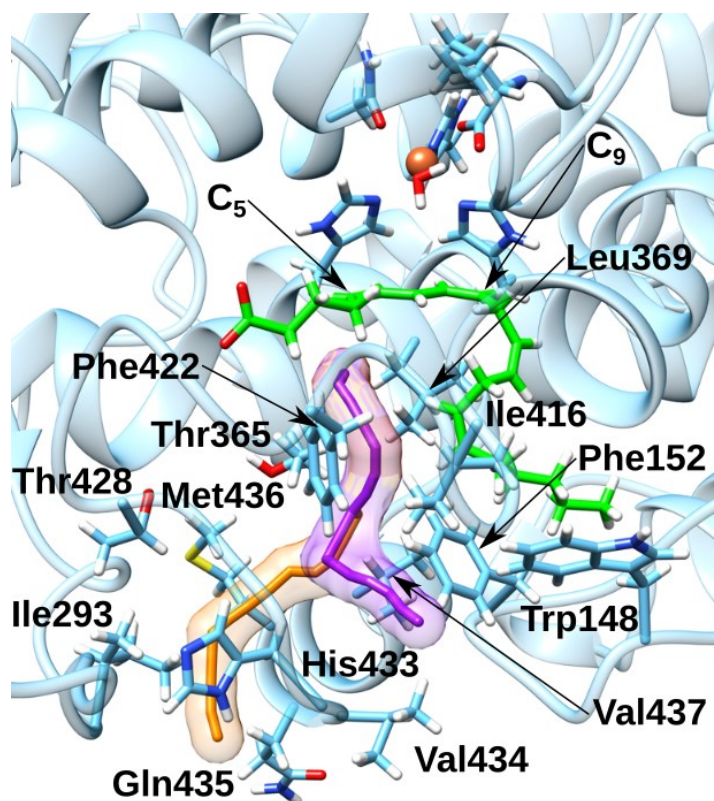


Figura 98. Representación del túnel representante de los dos clústeres obtenidos (en lila está indicado el mejor clúster, mientras que el segundo mejor está indicado en naranja) a partir de los canales calculados a través de los cuales una molécula de oxígeno puede acceder al centro activo de la h-5-LOX desde la superficie de ésta. Se han indicado los residuos que constituyen los túneles de dichos clústeres y los átomos de carbono C₅ y C₉ del AA. Se puede apreciar que ambos clústeres conducen exclusivamente al C₅.

8.3.4.2.2 Adición de la molécula de oxígeno

Una vez se han determinado los canales a través de los cuales puede tener lugar la adición de la molécula de oxígeno para el producto de la abstracción de $H_{7\text{proS}}$ del *snapshot* 15204, se ha utilizado dicho producto para colocar una molécula de oxígeno en el túnel representante del mejor clúster (ver Figura 98). Únicamente se ha considerado la oxigenación en el C_5 dado que los dos clústeres obtenidos conducen exclusivamente a dicho átomo de carbono. La molécula de oxígeno se colocó inicialmente a una distancia de aproximadamente 6.5 Å del C_5 . Se ha optimizado totalmente a nivel QM/MM el producto de abstracción de hidrógeno mencionado con la molécula de oxígeno, sólo manteniendo fijada la distancia entre el átomo de oxígeno más cercano de la molécula de oxígeno entrante y el C_5 ($d(C_5-O)$). Se ha empleado esta estructura optimizada como punto de partida para construir el perfil de energía potencial para el ataque de la molécula de oxígeno, en el cual se ha empleado $d(C_5-O)$ como coordenada de reacción. Es importante notar que la adición de la molécula de oxígeno al C_5 se produce de manera antarafacial respecto del cofactor $Fe(II)-OH_2$ (ver Figura 99), dando lugar a un radical peróxido que exhibe una isomería de dobles enlaces ($C_6=C_7$ *trans*(*E*) y $C_8=C_9$ *cis*(*Z*)) y una estereoquímica del C_5 (*S*) compatibles con la estructura experimental de 5(*S*)-HpETE. La molécula de oxígeno penetra en el canal sin barrera hasta alcanzar un mínimo de energía que ha sido optimizado. Se puede apreciar que la estructura resultante de dicha optimización corresponde a la estructura del radical peróxido ($d(C_5-O) = 1.50$ Å; Figura 99). Es importante subrayar que dicha oxigenación es altamente exoérgica (-38.8 kcal/mol).

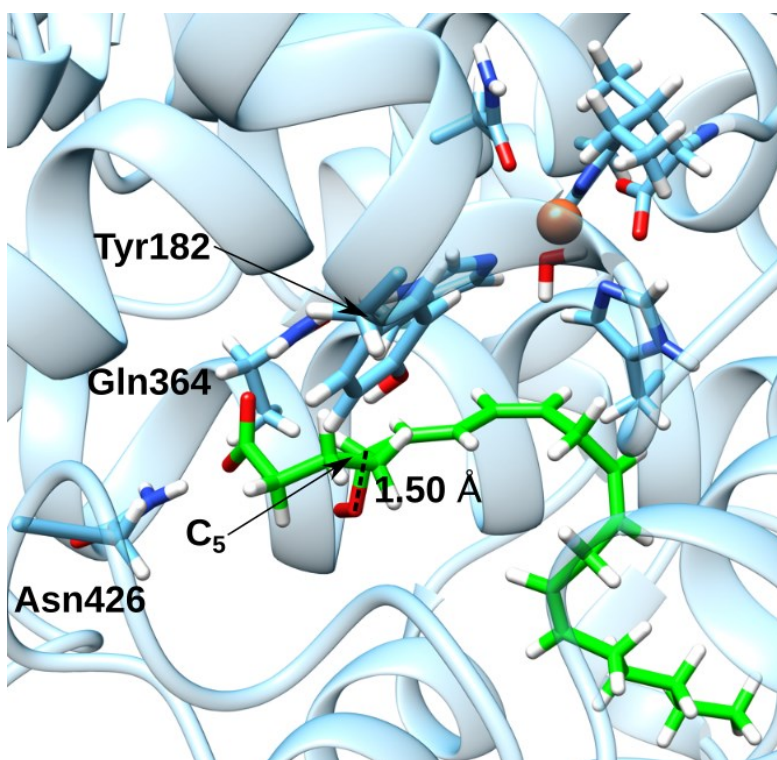


Figura 99. Estructura de producto correspondiente a la adición de una molécula de oxígeno al C_5 del AA.

8.3.4.3 Rotación de uno de los enlaces C-C que contiene el grupo radical peróxido

Para formar el 5(*S*)-HpETE tras la adición de la molécula de oxígeno al C₅, es necesario que se produzca una retrodonación de hidrógeno al radical peróxido para formar el correspondiente hidroperóxido.

Debido al hecho de que la molécula de oxígeno ataca al radical π -pentadienilo proveniente del AA en el C₅ antarafacialmente respecto del átomo de Fe, es necesaria una rotación de uno de los enlaces C-C que contiene el grupo peróxido para lograr una disposición suprafacial y hacer viable la retrodonación de hidrógeno, el cual provendría del cofactor Fe(II)-OH₂ de la enzima.

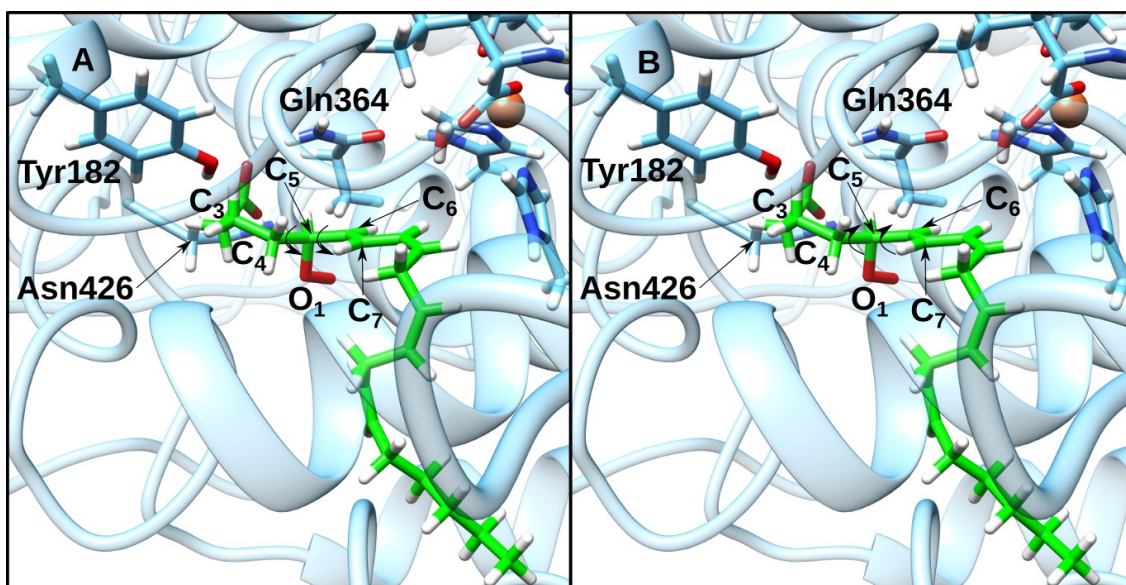


Figura 100. Definición de las dos rotaciones C-C antihorarias (panel A) y horarias (panel B) consideradas en el producto optimizado de la oxigenación del AA en el C₅. Estos sentidos de rotación están definidos mirando el sustrato desde su extremo hidrofóbico.

Se ha seleccionado el producto optimizado de la oxigenación del AA en el C₅ (Figura 99) como punto de partida para iniciar la rotación comentada. Se definió la coordenada de reacción para alcanzar una disposición suprafacial del radical peróxido como una rotación alrededor de uno de los enlaces C-C que contiene dicho grupo. Este movimiento puede ser descrito por un ángulo diedro centrado en los átomos de carbono que definen el enlace alrededor del cual se lleva a cabo dicha rotación. De los diferentes ángulos diedros que cumplen lo que se acaba de exponer, se han escogido los ángulos diedros $\angle(O_1-C_5-C_6-C_7)$ y $\angle(O_1-C_5-C_4-C_3)$ dado que parecen los más adecuados para conseguir una disposición suprafacial del grupo radical peróxido sin involucrar barreras de energía potencial demasiado altas. Además, es posible definir dos sentidos de rotación para cada ángulo diedro, horario y antihorario (estos sentidos de rotación están definidos mirando al sustrato desde su extremo hidrofóbico, ver paneles A y B de la Figura 100). Por consiguiente, hay cuatro posibles rotaciones de ángulos diedros para alcanzar dicha disposición suprafacial. Ninguna de las rotaciones de $\angle(O_1-C_5-C_6-C_7)$ consiguieron que el

grupo peróxido lograrse una disposición suprafacial. Este resultado pone de manifiesto la naturaleza flexible del sustrato. Nuestros cálculos a lo largo de ambos sentidos de rotación para dicho diedro muestran que el radical peróxido apenas puede progresar a una disposición suprafacial, mientras que el resto de átomos del AA son los que se reorganizan en ambos sentidos de dicha rotación. En cambio, ambos sentidos de rotación de $\langle(O_1-C_5-C_4-C_3)\rangle$ consiguieron que dicho grupo logre una disposición casi suprafacial tras una importante reorganización de los átomos de carbono C_3 , C_4 y C_5 del AA. Aunque con ambos sentidos de rotación de $\langle(O_1-C_5-C_4-C_3)\rangle$ se podría proseguir para alcanzar una disposición totalmente suprafacial del grupo peróxido, únicamente se va a mostrar la del sentido horario (ver panel B de la Figura 100), ya que a partir de su producto casi suprafacial (Figura 101) se obtienen barreras de energía potencial menores para los procesos posteriores que restan. Dicha rotación exhibe un perfil de energía potencial con una curva bastante suave. El producto casi suprafacial (Figura 101) aparece a -59.7° involucrando una barrera de energía potencial de 0.7 kcal/mol y una energía de reacción de -11.1 kcal/mol. Por lo tanto, la obtención de este producto supone superar una barrera de energía potencial sustancialmente pequeña y una energía de reacción bastante exoérgica.

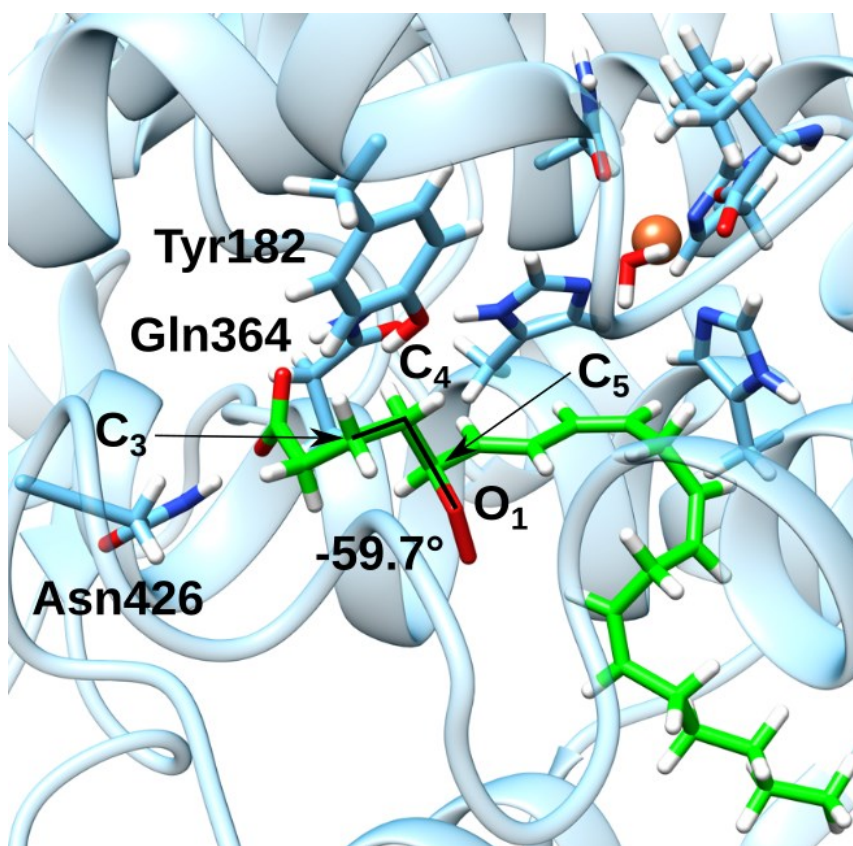


Figura 101. Estructura de producto correspondiente a la rotación de $\langle(O_1-C_5-C_4-C_3)\rangle$ en sentido horario conduciendo a una disposición casi suprafacial del radical peróxido del C_5 del AA, donde al átomo de oxígeno del radical peróxido que ha de experimentar la retrodonación de hidrógeno proveniente del cofactor $Fe(II)-OH_2$ no está bien orientado para ésta.

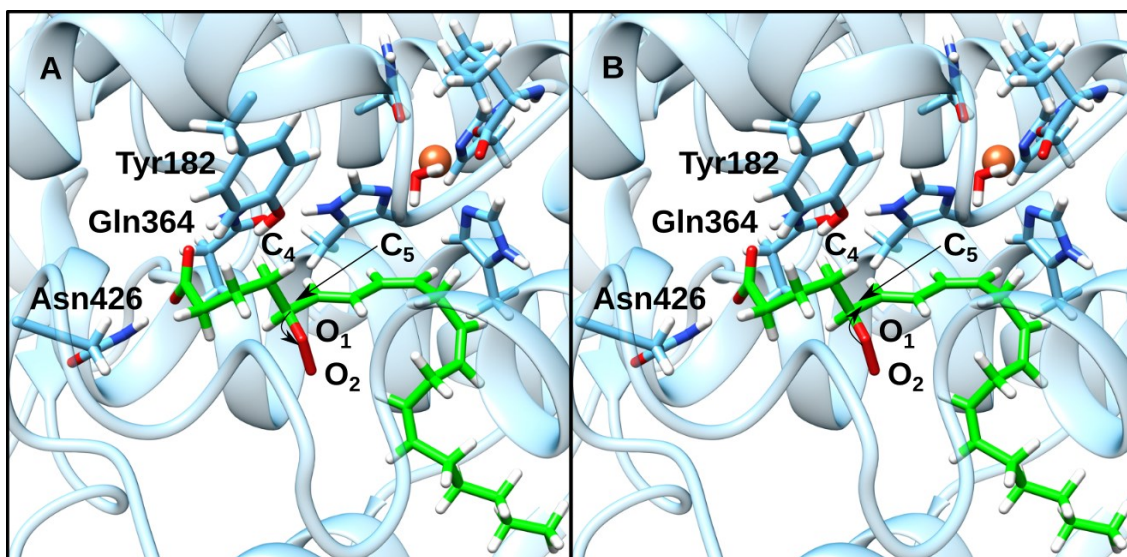


Figura 102. Definición del sentido antihorario (panel A) y horario (panel B) de la rotación del diedro $\angle(O_2-O_1-C_5-C_6)$ considerada en el producto casi suprafacial optimizado de la rotación de $\angle(O_1-C_5-C_4-C_3)$ en sentido horario. Estos sentidos de rotación están definidos mirando el sustrato en la dirección del enlace C_5-O_1 , quedando O_1 por delante de C_5 .

A partir de la geometría optimizada del producto casi suprafacial de la rotación en sentido horario de $\angle(O_1-C_5-C_4-C_3)$, se ha realizado la rotación del ángulo diedro $\angle(O_2-O_1-C_5-C_6)$ para orientar el átomo de oxígeno del radical peróxido que ha de recibir el átomo de hidrógeno hacia el cofactor $Fe(II)-OH_2$, que es quien lo va a transferir. Como antes, dicha rotación puede realizarse en dos sentidos, horario y antihorario (estos sentidos de rotación están definidos mirando el sustrato en la dirección del enlace C_5-O_1 , quedando O_1 por delante de C_5 , ver paneles A y B de la Figura 102). Ambos sentidos de rotación de $\angle(O_2-O_1-C_5-C_6)$ logran orientar al átomo de oxígeno del radical peróxido que ha de experimentar la retrodonación de hidrógeno hacia el cofactor $Fe(II)-OH_2$. Además, ambos sentidos exhiben un perfil de energía potencial con una curva bastante suave y una barrera de energía potencial notablemente pequeña (2.4 kcal/mol para el sentido antihorario y 0.4 kcal/mol para el sentido horario). Únicamente se va a mostrar el producto de la rotación en sentido antihorario de $\angle(O_2-O_1-C_5-C_6)$ (Figura 103) dado que a partir de éste se obtiene una barrera de energía potencial sustancialmente menor para la subsiguiente retrodonación de hidrógeno. Dicho producto (Figura 103) aparece a 80.8° involucrando una barrera de energía potencial de 2.4 kcal/mol, como se ha mencionado más arriba, y una energía de reacción de -1.4 kcal/mol.

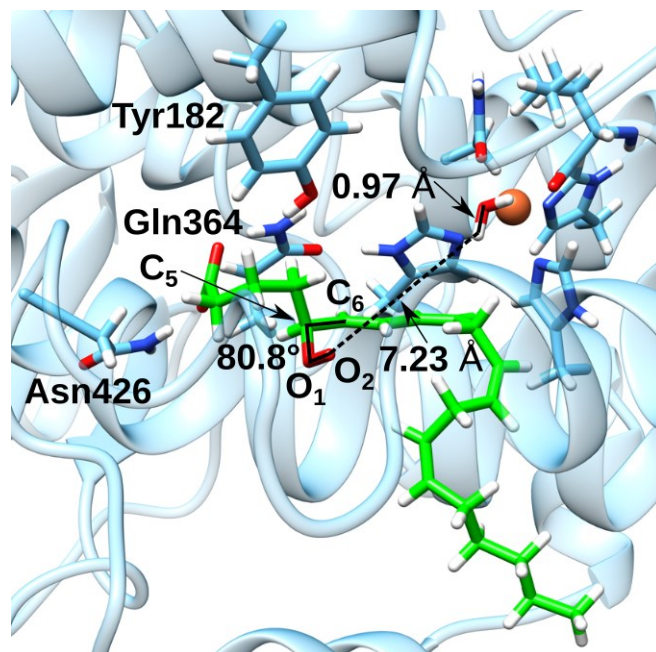


Figura 103. Estructura de productos correspondiente a la rotación de $\langle(O_2-O_1-C_5-C_6)$ en sentido horario el cual muestra al átomo de oxígeno del radical peróxido que ha de experimentar la retrodonación de hidrógeno bien orientado para ésta, es decir, orientado hacia el cofactor Fe(II)-OH₂. Además, se han indicado las distancias de interés desde un punto de vista de la posterior retrodonación de hidrógeno.

8.3.4.4 Retrodonación de un átomo de hidrógeno al grupo radical peróxido

Una vez el grupo radical peróxido ha alcanzado una disposición casi suprafacial y el átomo de oxígeno más externo de dicho peróxido, el que ha de recibir el átomo de hidrógeno de la retrodonación, está orientado hacia el cofactor Fe(II)-OH₂, únicamente resta aproximar este átomo de oxígeno hacia uno de los átomos de hidrógeno de dicho cofactor para que la retrodonación de un átomo de hidrógeno tenga lugar. Con el objetivo de que dicha retrodonación ocurra, se ha escogido como coordenada de reacción la diferencia entre la longitud del enlace que se rompe (O-H del OH₂ del cofactor) y la longitud del enlace que se forma (O-H del grupo hidroperóxido resultante).

Como punto de partida para este perfil de reacción, se ha escogido la estructura optimizada a nivel QM/MM del producto de la rotación del diedro $\langle(O_2-O_1-C_5-C_6)$ en sentido horario (ver Figura 103). Este proceso presenta dos barreras de energía potencial. Por un lado, la primera barrera corresponde a que el grupo radical peróxido adopte una disposición totalmente suprafacial y a que su átomo de oxígeno más externo se aproxime lo suficiente al átomo de hidrógeno del cofactor Fe(II)-OH₂ que será retrodonado, quedando éstos enfrentados, de manera que dicha retrodonación pueda tener lugar (ver paneles A y B de la Figura 104). Visualizando las estructuras correspondientes a la primera barrera del perfil de reacción, se puede apreciar que a fin de que suceda lo anteriormente descrito, se tiene que producir una importante reorganización del sustrato, más concretamente, de sus diez primeros átomos de carbono. Todo este proceso sucede

con una barrera de energía potencial de 21.1 kcal/mol y una energía de reacción de 9.2 kcal/mol (ver paneles A y B de la Figura 104).

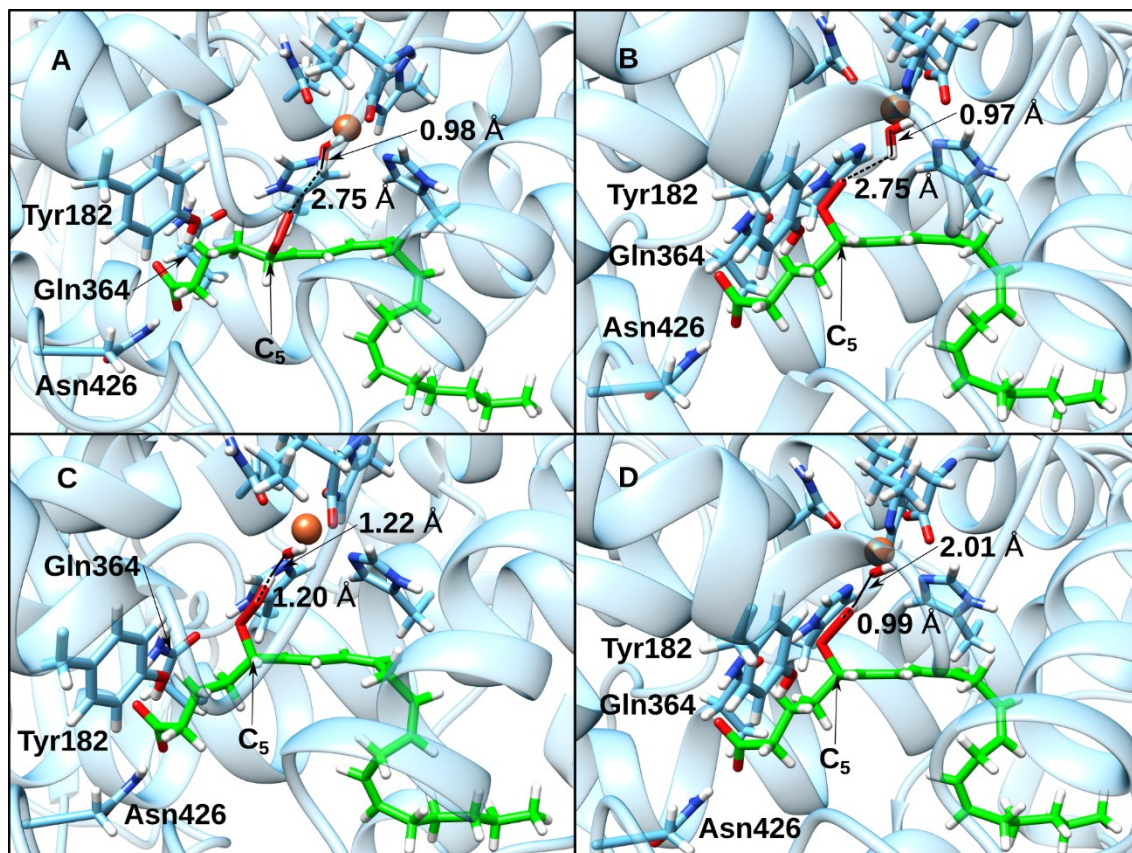


Figura 104. Estructuras de TS y producto para las dos barreras de energía potencial que exhibe la retrodonación de un átomo de hidrógeno al grupo radical peróxido donde los paneles A y B corresponden a la primera barrera (estructura de TS y producto, respectivamente), mientras que los paneles C y D corresponden a la segunda (estructura de TS y producto, respectivamente). Se puede apreciar que se ha formado el 5(*S*)-HpETE en la estructura de producto final de la retrodonación (panel D).

Por otra parte, la segunda barrera de energía potencial corresponde a la retrodonación de un átomo de hidrógeno propiamente. Debido a que la curva para esta segunda barrera del presente perfil de energía potencial no es demasiado suave, se ha calculado un perfil de energía potencial adicional para determinarla con más exactitud. Para construir este perfil adicional se ha utilizado la misma coordenada de reacción, pero se ha usado como punto de partida la estructura de producto de la retrodonación de hidrógeno obtenida con el perfil anterior optimizada a nivel QM/MM (ver panel D de la Figura 104). Este nuevo perfil (Figura 105), sí que muestra una curva suave y la correspondiente estructura de máxima energía localizada (ver panel C de la Figura 104) involucra una barrera de energía potencial de 20.7 kcal/mol y una energía de reacción de 6.0 kcal/mol respecto del mínimo de energía potencial localizado con este nuevo perfil de reacción el cual es anterior a que tenga lugar la retrodonación de hidrógeno. Como resultado de este proceso, el radical peróxido es reducido a un grupo hidroperóxido generando el 5(*S*)-HpETE (ver panel D de la Figura 104), que es el producto final de la etapa de hidroperoxidación

catalizada por la h-5-LOX, y el cofactor Fe(III)-OH⁻ se ha regenerado para iniciar un nuevo ciclo catalítico, el cual debería conducir a la formación del 5,6-epóxido.

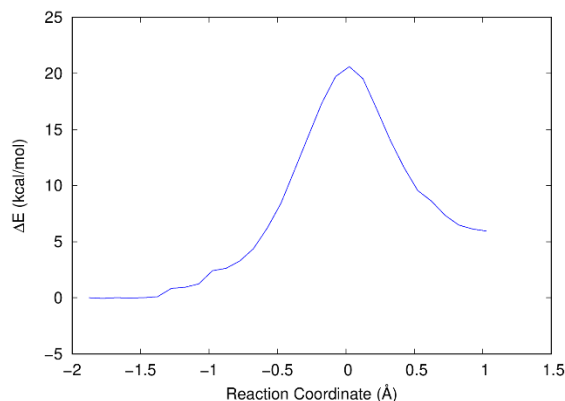


Figura 105. Perfil de energía potencial correspondiente al perfil adicional calculado para determinar con más exactitud la segunda barrera de energía potencial que presentaba el perfil original de la retrodonación de hidrógeno.

8.3.4.5 Abstracción del H_{10proR} del 5(*S*)-HpETE

El primer paso de la etapa de epoxidación consiste en la abstracción de H_{10proR} del C₁₀ del 5(*S*)-HpETE resultante de la etapa de hidroperoxidación para generar un radical deslocalizado entre los átomos de carbono C₆ y C₁₂, es decir, un radical π -heptatrienilo. Se ha escogido como punto de partida para calcular el perfil de energía potencial de dicha abstracción de hidrógeno la geometría optimizada del producto final de la retrodonación de hidrógeno, es decir, del 5(*S*)-HpETE (ver panel D de la Figura 104) cuyo átomo de hidrógeno del C₁₀ más cercano al átomo de oxígeno aceptor de hidrógeno del cofactor Fe(III)-OH⁻ es el ya mencionado H_{10proR}, tal y como sugieren los resultados experimentales³⁷⁸. La coordenada de reacción para este perfil de reacción se ha definido como la diferencia entre la longitud del enlace que se rompe (C₁₀-H_{10proR}) y la longitud del enlace que se forma (H_{10proR}-O). De manera similar al caso de la retrodonación de hidrógeno, primero se calculó el perfil de reacción para la abstracción de H_{10proR} en sentido de reactivos a productos. Aunque a partir del mínimo de energía obtenido una vez se ha transferido el H_{10proR} al cofactor Fe(III)-OH⁻ se ha podido localizar tras una optimización el correspondiente producto de dicha abstracción (ver panel B de la Figura 106), la barrera de energía potencial resultante era muy elevada (alrededor de 30 kcal/mol). Antes de continuar, cabe destacar que dicho producto contiene un sistema plano de siete electrones deslocalizados sobre siete átomos de carbono, concretamente sobre los átomos de carbono entre C₆ y C₁₂ ambos incluidos, es decir, se ha formado el esperado radical deslocalizado π -heptatrienilo. Por esta razón, se calculó un nuevo perfil de energía potencial utilizando la misma coordenada de reacción, pero ahora escogiendo como punto de partida el producto correspondiente a la abstracción de H_{10proR} (*back scan*) obtenido del perfil anterior (ver panel B de la Figura 106). Este nuevo perfil (Figura 107) exhibe una curva suave y una barrera de energía potencial sustancialmente más pequeña, concretamente de 16.0 kcal/mol. Además, la energía de reacción para este nuevo perfil es

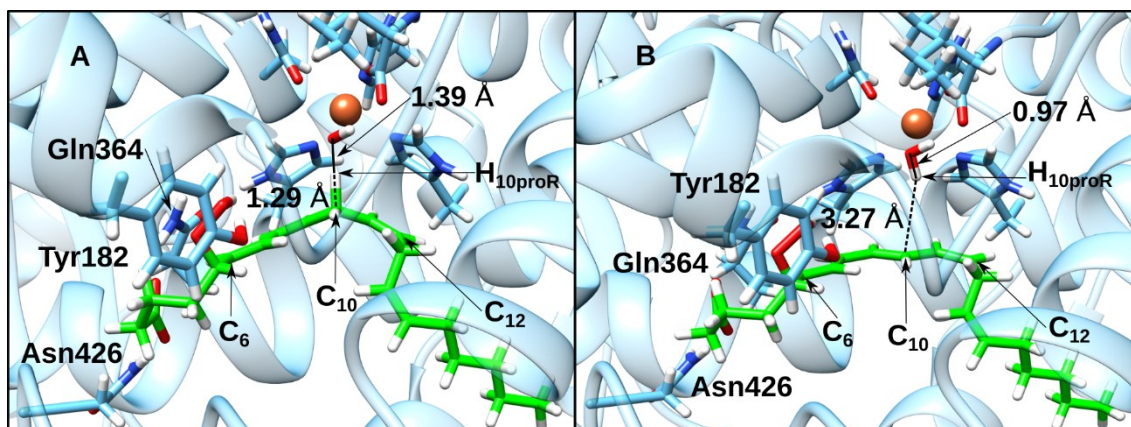


Figura 106. Estructuras de TS (panel A) y producto (panel B) para la abstracción de $H_{10\text{proR}}$ del 5(*S*)-HpETE. En la estructura de producto se puede apreciar que, tras dicha abstracción, se forma el radical deslocalizado π -heptatrienilo entre los átomos de carbono C_6 y C_{12} .

de -24.2 kcal/mol. Por otra parte, cuanto mayor sea la deslocalización del radical formado, mayor será la estabilización de la abstracción de hidrógeno a la cual se encuentra acoplada la formación de dicho radical. De hecho, esto se ha podido comprobar para las diferentes abstracciones de hidrógeno estudiadas a lo largo de la sección 8.3.4, ya que la barrera de energía potencial para la abstracción de $H_{7\text{proS}}$ donde se forma un radical π -pentadienilo es mayor que la correspondiente barrera para la abstracción de $H_{10\text{proR}}$ donde se forma un radical π -heptatrienilo.

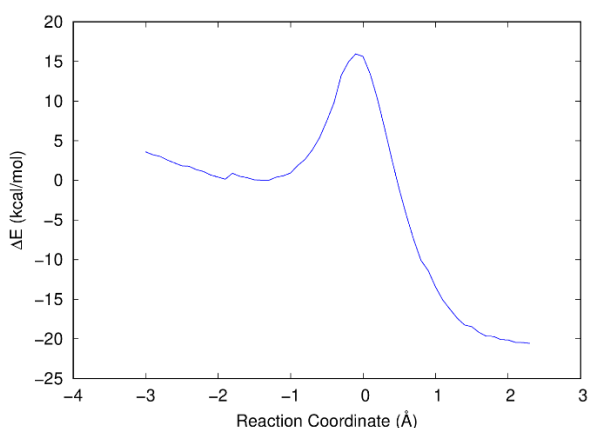


Figura 107. Perfil de energía potencial para la abstracción de $H_{10\text{proR}}$ utilizando como punto de partida el producto de dicha abstracción obtenido de un perfil previo.

Debido a limitaciones de tiempo, no se ha podido completar en la presente tesis el estudio del último paso de la etapa de epoxidación que consiste en la formación del 5,6-epóxido, la cual conduciría al LTA₄ final. El mecanismo de este último paso no está claro en absoluto, por lo que se requerirá un coste de cálculo elevado. Este estudio ya se ha comenzado, pero no se concluirá hasta realizar la etapa postdoctoral que se empezará a continuación de esta tesis.

8.3.5 Conclusiones

Hasta la fecha, no se había realizado ningún estudio mecanístico teórico del proceso enzimático de la h-5-LOX *wild-type* sobre el AA, el cual es su sustrato natural. Se ha podido apreciar que todos los pasos estudiados de dicho proceso enzimático son congruentes con los datos experimentales, ya que los átomos de hidrógeno abstraídos tenían la proquiralidad adecuada y que los diferentes productos obtenidos de los diferentes pasos estudiados presentaban la estereoquímica que se observa experimentalmente, tanto para los dobles enlaces C=C como para los átomos de carbono quirales. Todo esto sugiere que el modo de unión del AA (*head-first*) dentro de la cavidad de h-5-LOX *wild-type* encontrado es el modo reactivo.

Por último, cabe destacar que el estudio de la formación de LTA₄ catalizada por la h-5-LOX partiendo del AA como sustrato inicial es especialmente interesante debido a que puede conducir al diseño de fármacos antiinflamatorios que inhibirían selectivamente la h-5-LOX, lo cual supondría un gran avance, ya que actualmente no se encuentran disponibles en el mercado este tipo de fármacos.

Parte V

Conclusiones Generales

Capítulo 9

Conclusiones Generales

Debido a que al final de cada capítulo de resultados ya se ha incorporado un apartado donde se exponen las conclusiones que se pueden extraer a partir de los resultados que aparecen a lo largo de dicho capítulo, a continuación, se van a enumerar brevemente las conclusiones principales que se pueden derivar de la totalidad de resultados expuestos a lo largo de la presente tesis:

- A partir del estudio a nivel molecular del mecanismo de formación de lipoxinas mediante la ruta biosintética de 5(*S*),15(*S*)-diHpETE catalizada por la 15-LOX-1 de reticulocito considerando 5(*S*),15(*S*)-diHpETE y 5(*S*),15(*S*)-diHETE como sustratos, se ha podido determinar que teniendo en cuenta exclusivamente la primera etapa de abstracción de hidrógeno del C₁₀, ambos sustratos podrían actuar como intermedios de las lipoxinas. Sin embargo, en relación con la etapa de adición de una molécula de oxígeno, se ha podido establecer que para 5(*S*),15(*S*)-diHETE dicha adición no es posible, mientras que para 5(*S*),15(*S*)-diHpETE sólo se produce en su C₁₄ de manera antarafacial respecto del cofactor Fe(II)-OH₂, cosa que explica la formación de únicamente LXB₄ tras la acción de una reductasa.
- Es bien conocido que el método más empleado para hacer una estimación de la barrera de energía de Gibbs de una reacción enzimática ha sido el promedio exponencial. Sin embargo, su justificación y aplicación en la práctica son cuestionables. A partir de la teoría de *Free Energy Perturbation* se ha desarrollado un protocolo alternativo que también hace uso del promedio exponencial, pero éste incluye la contribución tanto de las estructuras no precatalíticas como de las precatalíticas y, además, no requiere la elección arbitraria de ninguna estructura

particular para calcular un potencial de fuerza media, cuya exploración entorno a dicha estructura acostumbra a ser bastante pobre.

- Experimentalmente, se ha podido determinar que la 15-LOX en solución se encuentra en un equilibrio monómero-dímero donde el dímero está constituido por dos conformeros diferentes. Nuestros estudios teóricos de mutagénesis de aminoácidos que son importantes para la estabilidad de la interfase de dicho dímero, junto con algunos experimentos, sugieren que esta heterogeneidad conformacional es una propiedad intrínseca del dominio catalítico e indican que estas mutaciones inducen alteraciones estructurales respecto del dímero *wild-type* que se propagan hasta el centro catalítico modificando la actividad catalítica de la enzima. De hecho, se ha observado que la introducción de cargas negativas en las posiciones 181 o 585 reduce la eficiencia catalítica de la oxigenación de LA, mientras que la aumenta para AA, dándose la situación opuesta respecto de la 15-LOX-1 de conejo *wild-type*.
- Aunque el residuo Gln596 no contribuye directamente a la geometría del centro activo, ni está involucrado en la unión del AA, el cual es el sustrato principal de las LOXs de mamífero, a dicho centro activo, se conserva en la mayoría de ortólogos de 15-LOX de mamíferos superiores. En esta tesis hemos determinado mediante cálculos de *docking* y de MD que dicho residuo afecta de manera indirecta a la geometría del centro activo de la 15-LOX-1 de conejo, ayuda a establecer la especificidad de reacción de la enzima y, además, es importante para el carácter alostérico del dímero de la 15-LOX-1.
- En relación con los nuevos inhibidores específicos de sustrato de 15-LOX *N-Substituted 5-(1H-Indol-2-yl)-2-methoxyanilines*, los cuales inhiben selectivamente la actividad oxigenasa del LA, mientras que la del AA se mantiene prácticamente inalterada, se ha podido determinar que éstos ejercen su actividad inhibidora mediante un mecanismo alostérico donde el grupo 2-metoxianilina unido al núcleo farmacóforo parece ser crucial para su inhibición selectiva.
- La comprensión a nivel molecular del modo de unión al centro activo de la COX-2 de los fármacos celecoxib y rofecoxib ha permitido el diseño racional de inhibidores prometedores específicos de dicha enzima que incorporan un fotointerruptor tipo azobenceno, los cuales deberían exhibir una potencia antiinflamatoria similar a la de los compuestos originales, pero no los efectos secundarios típicos de dichos predecesores.
- A partir del estudio mecanístico teórico de la formación de LTA₄ catalizada por la h-5-LOX partiendo del AA como sustrato inicial, se ha podido determinar el modo de unión reactivo del AA (*head-first*) dentro de la cavidad de h-5-LOX *wild-type*, ya que todos los pasos estudiados de dicho proceso enzimático son congruentes con los datos experimentales.

Bibliografía

- (1) Serhan, C. N.; Ward, P. A.; Gilroy, D. W. *Fundamentals of Inflammation*; Cambridge University Press, **2010**. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139195737>.
- (2) Serhan, C. N.; Gupta, S. K.; Perretti, M.; Godson, C.; Brennan, E.; Li, Y.; Soehnlein, O.; Shimizu, T.; Werz, O.; Chiurchiù, V.; Azzi, A.; Dubourdeau, M.; Gupta, S. S.; Schopohl, P.; Hoch, M.; Gjorgevikj, D.; Khan, F. M.; Brauer, D.; Tripathi, A.; Cesnulevicius, K.; Lescheid, D.; Schultz, M.; Särndahl, E.; Repsilber, D.; Kruse, R.; Sala, A.; Haeggström, J. Z.; Levy, B. D.; Filep, J. G.; Wolkenhauer, O. The Atlas of Inflammation Resolution (AIR). *Mol. Aspects Med.*, **2020**, 74, 100894. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2020.100894>.
- (3) Furman, D.; Campisi, J.; Verdin, E.; Carrera-Bastos, P.; Targ, S.; Franceschi, C.; Ferrucci, L.; Gilroy, D. W.; Fasano, A.; Miller, G. W.; Miller, A. H.; Mantovani, A.; Weyand, C. M.; Barzilai, N.; Goronzy, J. J.; Rando, T. A.; Effros, R. B.; Lucia, A.; Kleinstreuer, N.; Slavich, G. M. Chronic Inflammation in the Etiology of Disease across the Life Span. *Nat. Med.*, **2019**, 25 (12), 1822–1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>.
- (4) Asher, A.; Tintle, N. L.; Myers, M.; Lockshon, L.; Bacareza, H.; Harris, W. S. Blood Omega-3 Fatty Acids and Death from COVID-19: A Pilot Study. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids*, **2021**, 166, 102250. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2021.102250>.
- (5) Panigrahy, D.; Gilligan, M. M.; Huang, S.; Gartung, A.; Cortés-Puch, I.; Sime, P. J.; Phipps, R. P.; Serhan, C. N.; Hammock, B. D. Inflammation Resolution: A Dual-Pronged Approach to Averting Cytokine Storms in COVID-19? *Cancer and Metastasis Rev.*, **2020**, 39(2), 337–340. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09889-4>.

- (6) Wang, L.; Zhang, Y.; Zhang, S. Cardiovascular Impairment in COVID-19: Learning From Current Options for Cardiovascular Anti-Inflammatory Therapy. *Front. Cardiovasc. Med.*, **2020**, *7*, 78. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2020.00078/BIBTEX>.
- (7) Marshall, M. How COVID-19 Can Damage the Brain. *Nature*, **2020**, 585 (7825), 342–343. <https://doi.org/10.1038/D41586-020-02599-5>.
- (8) Das, U. N. Can Bioactive Lipids Inactivate Coronavirus (COVID-19)? *Arch. Med. Res.*, **2020**, *51* (3), 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.03.004>.
- (9) Bannenberg, G.; Serhan, C. N. Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators in the Inflammatory Response: An Update. *Biochim Biophys Acta.*, **2010**, 1801(12), 1260–1273. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2010.08.002>.
- (10) Serhan, C. N. Treating Inflammation and Infection in the 21st Century: New Hints from Decoding Resolution Mediators and Mechanisms. *FASEB J.*, **2017**, *31*(4), 1273–1288. <https://doi.org/10.1096/fj.201601222R>.
- (11) Parnham, M. J.; Schmidtko, A. *Lipoxygenases in Inflammation*; Springer International Publishing, **2016**. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-27766-0>.
- (12) Cebrián-Prats, A.; González-Lafont, À.; Lluch, J. M. Unraveling the Molecular Details of the Complete Mechanism That Governs the Synthesis of Prostaglandin G2 Catalyzed by Cyclooxygenase-2. *ACS Omega*, **2019**, *4* (1), 2063–2074. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.8B03575/SUPPL_FILE/AO8B03575_SI_001.PDF.
- (13) Cebrián-Prats, A.; González-Lafont, À.; Lluch, J. M. Understanding the Molecular Details of the Mechanism That Governs the Oxidation of Arachidonic Acid Catalyzed by Aspirin-Acetylated Cyclooxygenase-2. *ACS Catal.*, **2020**, *10* (1), 138–153. https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.9B04223/SUPPL_FILE/CS9B04223_SI_001.PDF.
- (14) Szweda, M.; Rychlik, A.; Babińska, I.; Pomianowski, A. Significance of Cyclooxygenase-2 in Oncogenesis. *J. Vet. Res.*, **2019**, *63* (2), 215. <https://doi.org/10.2478/JVETRES-2019-0030>.
- (15) Kirkby, N. S.; Chan, M. V.; Zaiss, A. K.; Garcia-Vaz, E.; Jiao, J.; Berglund, L. M.; Verdu, E. F.; Ahmetaj-Shala, B.; Wallace, J. L.; Herschman, H. R.; Gomez, M. F.; Mitchell, J. A. Systematic Study of Constitutive Cyclooxygenase-2 Expression: Role of NF-KB and NFAT Transcriptional Pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2016**, *113* (2), 434–439. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1517642113>.

- (16) Kirkby, N. S.; Sampaio, W.; Etelvino, G.; Alves, D. T.; Anders, K. L.; Temponi, R.; Shala, F.; Nair, A. S.; Ahmetaj-Shala, B.; Jiao, J.; Herschman, H. R.; Xiaomeng, W.; Wahli, W.; Santos, R. A.; Mitchell, J. A. Cyclooxygenase-2 Selectively Controls Renal Blood Flow Through a Novel PPAR β/δ -Dependent Vasodilator Pathway. *Hypertens.*, **2018**, 71 (2), 297–305. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09906>.
- (17) Kirkby, N. S.; Raouf, J.; Ahmetaj-Shala, B.; Liu, B.; Mazi, S. I.; Edin, M. L.; Chambers, M. G.; Korotkova, M.; Wang, X.; Wahli, W.; Zeldin, D. C.; Nüsing, R.; Zhou, Y.; Jakobsson, P. J.; Mitchell, J. A. Mechanistic Definition of the Cardiovascular MPGES-1/COX-2/ADMA Axis. *Cardiovasc. Res.*, **2020**, 116 (12), 1972–1980. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVZ290>.
- (18) Shamsudin Khan, Y.; Kazemi, M.; Gutiérrez-De-Terán, H.; Åqvist, J. Origin of the Enigmatic Stepwise Tight-Binding Inhibition of Cyclooxygenase-1. *Biochemistry*, **2015**, 54 (49), 7283–7291. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.5B01024>.
- (19) Khan, Y. S.; Gutiérrez-De-Terán, H.; Åqvist, J. Molecular Mechanisms in the Selectivity of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Biochemistry*, **2018**, 57 (7), 1236–1248. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.7B01019>.
- (20) Khan, Y. S.; Gutiérrez-De-Terán, H.; Åqvist, J. Probing the Time Dependency of Cyclooxygenase-1 Inhibitors by Computer Simulations. *Biochemistry*, **2017**, 56 (13), 1911–1920. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.6B01006>.
- (21) Bekhit, A. A.; Nasralla, S. N.; El-Agroudy, E. J.; Hamouda, N.; El-Fattah, A. A.; Bekhit, S. A.; Amagase, K.; Ibrahim, T. M. Investigation of the Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of Promising Pyrazole Derivative. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2022**, 168, 106080. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2021.106080>.
- (22) Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. Photoisomerization in Different Classes of Azobenzene. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41 (5), 1809–1825. <https://doi.org/10.1039/C1CS15179G>.
- (23) Schneider, C.; Pratt, D. A.; Porter, N. A.; Brash, A. R. Control of Oxygenation in Lipoyxygenase and Cyclooxygenase Catalysis. *Chem. Biol.*, **2007**, 14 (5), 473–488. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2007.04.007>.
- (24) Joo, Y. C.; Oh, D. K. Lipoyxygenases: Potential Starting Biocatalysts for the Synthesis of Signaling Compounds. *Biotechnol. Adv.*, **2012**, 30, 1524–1532. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.004>.
- (25) Coffa, G.; Brash, A. R. A Single Active Site Residue Directs Oxygenation Stereospecificity in Lipoyxygenases: Stereocontrol Is Linked to the Position of Oxygenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2004**, 101 (44), 15579. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0406727101>.

- (26) Ivanov, I.; Heydeck, D.; Hofheinz, K.; Roffeis, J.; O'Donnell, V. B.; Kuhn, H.; Walther, M. Molecular Enzymology of Lipoxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2010**, 503 (2), 161–174. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2010.08.016>.
- (27) Schwarz, K.; Walther, M.; Anton, M.; Gerth, C.; Feussner, I.; Kuhn, H. Structural Basis for Lipoxygenase Specificity: CONVERSION OF THE HUMAN LEUKOCYTE 5-LIPOXYGENASE TO A 15-LIPOXYGENATING ENZYME SPECIES BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS *. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276 (1), 773–779. <https://doi.org/10.1074/JBC.M005114200>.
- (28) Vogel, R.; Jansen, C.; Roffeis, J.; Reddanna, P.; Forsell, P.; Claesson, H. E.; Kuhn, H.; Walther, M. Applicability of the Triad Concept for the Positional Specificity of Mammalian Lipoxygenases *. *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285 (8), 5369–5376. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.057802>.
- (29) Gillmor, S. A.; Villaseñor, A.; Fletterick, R.; Sigal, E.; Browner, M. F. The Structure of Mammalian 15-Lipoxygenase Reveals Similarity to the Lipases and the Determinants of Substrate Specificity. *Nat. Struct. Biol.*, **1997**, 4 (12), 1003–1009. <https://doi.org/10.1038/nsb1297-1003>.
- (30) Gilbert, N. C.; Gerstmeier, J.; Schexnaydre, E. E.; Börner, F.; Garscha, U.; Neau, D. B.; Werz, O.; Newcomer, M. E. Structural and Mechanistic Insights into 5-Lipoxygenase Inhibition by Natural Products. *Nat. Chem. Biol.*, **2020**, 16 (7), 783–790. <https://doi.org/10.1038/S41589-020-0544-7>.
- (31) Hammel, M.; Walther, M.; Prassl, R.; Kuhn, H. Structural Flexibility of the N-Terminal Beta-Barrel Domain of 15-Lipoxygenase-1 Probed by Small Angle X-Ray Scattering. Functional Consequences for Activity Regulation and Membrane Binding. *J. Mol. Biol.*, **2004**, 343 (4), 917–929. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2004.08.076>.
- (32) Smyrniotis, C. J.; Barbour, S. R.; Xia, Z.; Hixon, M. S.; Holman, T. R. ATP Allosterically Activates the Human 5-Lipoxygenase Molecular Mechanism of Arachidonic Acid and 5(S)-Hydroperoxy-6(E),8(Z),11(Z),14(Z)-Eicosatetraenoic Acid. *Biochemistry*, **2014**, 53 (27), 4407–4419. <https://doi.org/10.1021/bi401621d>.
- (33) Häfner, A. K.; Cernescu, M.; Hofmann, B.; Ermisch, M.; Hörnig, M.; Metzner, J.; Schneider, G.; Brutschy, B.; Steinhilber, D. Dimerization of Human 5-Lipoxygenase. *Biol. Chem.*, **2011**, 392 (12), 1097–1111. <https://doi.org/10.1515/BC.2011.200>.
- (34) Ivanov, I.; Shang, W.; Toledo, L.; Masgrau, L.; Svergun, D. I.; Stehling, S.; Gómez, H.; Di Venere, A.; Mei, G.; Lluch, J. M.; Skrzypczak-Jankun, E.; González-Lafont, À.; Kühn, H. Ligand-Induced Formation of Transient Dimers of Mammalian 12/15-Lipoxygenase: A Key to Allosteric Behavior of This Class of Enzymes? *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, **2012**, 80 (3), 703–712. <https://doi.org/10.1002/PROT.23227>.

- (35) Shang, W.; Ivanov, I.; Svergun, D. I.; Borbulevych, O. Y.; Aleem, A. M.; Stehling, S.; Jankun, J.; Kühn, H.; Skrzypczak-Jankun, E. Probing Dimerization and Structural Flexibility of Mammalian Lipoxygenases by Small-Angle X-Ray Scattering. *J. Mol. Biol.*, **2011**, 409 (4), 654–668. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2011.04.035>.
- (36) Sloane, D. L.; Browner, M. F.; Dauter, Z.; Wilson, K.; Fletterick, R. J.; Sigal, E. Purification and Crystallization of 15-Lipoxygenase from Rabbit Reticulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1990**, 173 (2), 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)80063-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80063-4).
- (37) Choi, J.; Jae, K. C.; Kim, S.; Shin, W. Conformational Flexibility in Mammalian 15S-Lipoxygenase: Reinterpretation of the Crystallographic Data. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **2008**, 70 (3), 1023–1032. <https://doi.org/10.1002/prot.21590>.
- (38) Cruz, A.; Di Venere, A.; Mei, G.; Zhuravlev, A.; Golovanov, A.; Stehling, S.; Heydeck, D.; Lluch, J. M.; González-Lafont, À.; Kuhn, H.; Ivanov, I. A Role of Gln596 in Fine-Tuning Mammalian ALOX15 Specificity, Protein Stability and Allosteric Properties. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, **2020**, 1865 (7), 158680. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2020.158680>.
- (39) Ivanov, I.; Cruz, A.; Zhuravlev, A.; Venere, A. Di; Nicolai, E.; Stehling, S.; Lluch, J. M.; González-lafont, À.; Kuhn, H. Conformational Heterogeneity and Cooperative Effects of Mammalian ALOX15. *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, 22 (6), 3285. <https://doi.org/10.3390/IJMS22063285>.
- (40) Gilbert, N. C.; Bartlett, S. G.; Waight, M. T.; Neau, D. B.; Boeglin, W. E.; Brash, A. R.; Newcomer, M. E. The Structure of Human 5-Lipoxygenase. *Science*, **2011**, 331 (6014), 217–219. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1197203/SUPPL_FILE/GILBERT.SOM.PDF.
- (41) Neau, D. B.; Bender, G.; Boeglin, W. E.; Bartlett, S. G.; Brash, A. R.; Newcomer, M. E. Crystal Structure of a Lipoxygenase in Complex with Substrate: The Arachidonic Acid-Binding Site of 8R-Lipoxygenase. *J. Biol. Chem.*, **2014**, 289 (46), 31905–31913. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.599662>.
- (42) Saura, P.; Maréchal, J. D.; Masgrau, L.; Lluch, J. M.; González-Lafont, À. Computational Insight into the Catalytic Implication of Head/Tail-First Orientation of Arachidonic Acid in Human 5-Lipoxygenase: Consequences for the Positional Specificity of Oxygenation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2016**, 18 (33), 23017–23035. <https://doi.org/10.1039/C6CP03973A>.

- (43) Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature*, **2021**, 596 (7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- (44) Härtel, B.; Ludwig, P.; Schewe, T.; Rapoport, S. M. Self-Inactivation by 13-Hydroperoxylinoleic Acid and Lipohydroperoxidase Activity of the Reticulocyte Lipoxygenase. *Eur. J. Biochem.*, **1982**, 126 (2), 353–357. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1982.TB06787.X>.
- (45) Schewe, T. 15-Lipoxygenase-1: A Prooxidant Enzyme. *Biol. Chem.*, **2002**, 383 (3–4), 365–374. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.041>.
- (46) Bryant, R. W.; Schewe, T.; Rapoport, S. M.; Bailey, J. M. Leukotriene Formation by a Purified Reticulocyte Lipoxygenase Enzyme. Conversion of Arachidonic Acid and 15-Hydroperoxyeicosatetraenoic Acid to 14, 15-Leukotriene A4. *J Biol Chem.*, **1985**, 25 (260(6)), 3548–3555. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83657-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83657-8).
- (47) Hatcher, E.; Soudackov, A. V.; Hammes-Schiffer, S. Proton-Coupled Electron Transfer in Soybean Lipoxygenase. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126 (18), 5763–5775. <https://doi.org/10.1021/JA039606O>.
- (48) Lehnert, N.; Solomon, E. I. Density-Functional Investigation on the Mechanism of H-Atom Abstraction by Lipoxygenase. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2003**, 8 (3), 294–305. <https://doi.org/10.1007/S00775-002-0415-6>.
- (49) Rickert, K. W.; Klinman, J. P. Nature of Hydrogen Transfer in Soybean Lipoxygenase 1: Separation of Primary and Secondary Isotope Effects. *Biochemistry*, **1999**, 38 (38), 12218–12228. https://doi.org/10.1021/BI990834Y/SUPPL_FILE/BI990834Y_S.PDF.
- (50) Maas, R. L.; Brash, A. R. Evidence for a Lipoxygenase Mechanism in the Biosynthesis of Epoxide and Dihydroxy Leukotrienes from 15(S)-Hydroperoxyicosatetraenoic Acid by Human Platelets and Porcine Leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1983**, 80 (10), 2884–2888. <https://doi.org/10.1073/PNAS.80.10.2884>.
- (51) Garssen, G. J.; Vliegthart, J. F.; Boldingh, J. An Anaerobic Reaction between Lipoxygenase, Linoleic Acid and Its Hydroperoxides. *Biochem. J.*, **1971**, 122 (3), 327. <https://doi.org/10.1042/BJ1220327>.

- (52) De Groot, J. J. M. C.; Garssen, G. J.; Vliegthart, J. F. G.; Boldingh, J. The Detection of Linoleic Acid Radicals in the Anaerobic Reaction of Lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1973**, 326 (2), 279–284. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(73\)90254-3](https://doi.org/10.1016/0005-2760(73)90254-3).
- (53) Garssen, G. J.; Vliegthart, J. F.; Boldingh, J. The Origin and Structures of Dimeric Fatty Acids from the Anaerobic Reaction between Soya-Bean Lipoxygenase, Linoleic Acid and Its Hydroperoxide. *Biochem. J.*, **1972**, 130 (2), 435. <https://doi.org/10.1042/BJ1300435>.
- (54) Kobe, M. J.; Newcomer, M. E. *Lipoxygenase Pathway of the Arachidonate Cascade*. Wiley Online Library, **2013**. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0023400>.
- (55) Samuelsson, B.; Borgeat, P.; Hammarström, S.; Murphy, R. C. Introduction of a Nomenclature: Leukotrienes. *Prostaglandins*, **1979**, 17 (6), 785–787. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(79\)90052-2](https://doi.org/10.1016/0090-6980(79)90052-2).
- (56) Haeggström, J. Z.; Funk, C. D. Lipoxygenase and Leukotriene Pathways: Biochemistry, Biology, and Roles in Disease. *Chem. Rev.*, **2011**, 111(10), 5866–5896. <https://doi.org/10.1021/cr200246d>.
- (57) Haeggström, J. Z.; Wetterholm, A. Enzymes and Receptors in the Leukotriene Cascade. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2002**, 59 (5), 742–753. <https://doi.org/10.1007/S00018-002-8463-1>.
- (58) Kuhn, H.; Banthiya, S.; Van Leyen, K. Mammalian Lipoxygenases and Their Biological Relevance. *Biochim. Biophys. Acta*, **2015**, 1851 (4), 308–330. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2014.10.002>.
- (59) Serhan, N.; Petasis, N. A.; Clish, C. B.; Arita, M.; Iolanda, C.; Fierro, M.; Colgan, S. P.; Bernasconi, G. Lipoxin A4 and Aspirin-Triggered 15-Epi-Lipoxin A4 Inhibit Human Neutrophil Migration: Comparisons Between Synthetic 15 Epimers in Chemotaxis and Transmigration with Microvessel Endothelial Cells and Epithelial Cells. *J. Immunol.*, **2003**, 170 (5), 2688–2694. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.170.5.2688>.
- (60) Ereso, A. Q.; Cureton, E. L.; Cripps, M. W.; Sadjadi, J.; Dua, M. M.; Curran, B.; Victorino, G. P. Lipoxin A4 Attenuates Microvascular Fluid Leak During Inflammation. *J. Surg. Res.*, **2009**, 156 (2), 183. <https://doi.org/10.1016/J.JSS.2009.01.009>.
- (61) Kebir, D. El; Filep, J. G. Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through B2 Integrins. *Front. Immunol.*, **2013**, 4, 60. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2013.00060/BIBTEX>.

- (62) Ohira, T.; Arita, M.; Omori, K.; Recchiuti, A.; Van Dykeand, T. E.; Serhan, C. N. Resolvin E1 Receptor Activation Signals Phosphorylation and Phagocytosis. *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285 (5), 3451. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.044131>.
- (63) Sachs-Olsen, C.; Sanak, M.; Lang, A. M.; Gielicz, A.; Mowinckel, P.; Lødrup Carlsen, K. C.; Carlsen, K. H.; Szczeklik, A. Eoxins: A New Inflammatory Pathway in Childhood Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2010**, 126 (4), 859-867. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2010.07.015>.
- (64) Hu, S.; Mao-Ying, Q. L.; Wang, J.; Wang, Z. F.; Mi, W. L.; Wang, X. W.; Jiang, J. W.; Huang, Y. L.; Wu, G. C.; Wang, Y. Q. Lipoxins and Aspirin-Triggered Lipoxin Alleviate Bone Cancer Pain in Association with Suppressing Expression of Spinal Proinflammatory Cytokines. *J. Neuroinflammation*, **2012**, 9, 278. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-278>.
- (65) Spite, M.; Clària, J.; Serhan, C. N. Resolvins, Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators and Their Potential Roles in Metabolic Diseases. *Cell Metab.*, **2014**, 19 (1), 21. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2013.10.006>.
- (66) Belkner, J.; Wiesner, R.; Kühn, H.; Lankin, V. Z. The Oxygenation of Cholesterol Esters by the Reticulocyte Lipoxygenase. *FEBS Lett.*, **1991**, 279 (1), 110–114. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80263-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80263-3).
- (67) Serhan, C. N.; Dalli, J.; Karamnov, S.; Choi, A.; Park, C.-K.; Xu, Z.-Z.; Ji, R.-R.; Zhu, M.; Petasis, N. A. Macrophage Proresolving Mediator Maresin 1 Stimulates Tissue Regeneration and Controls Pain. *FASEB J.*, **2012**, 26 (4), 1755. <https://doi.org/10.1096/FJ.11-201442>.
- (68) Serhan, C. N.; Hamberg, M.; Samuelsson, B. Lipoxins: Novel Series of Biologically Active Compounds Formed from Arachidonic Acid in Human Leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1984**, 81 (17 I), 5335–5339. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.17.5335>.
- (69) Folco, G.; Murphy, R. C. Eicosanoid Transcellular Biosynthesis: From Cell-Cell Interactions to in Vivo Tissue Responses. *Pharmacol. Rev.*, **2006**, 58 (3), 375–388. <https://doi.org/10.1124/PR.58.3.8>.
- (70) Hofheinz, K.; Kakularam, K. R.; Adel, S.; Anton, M.; Polymarasetty, A.; Reddanna, P.; Kuhn, H.; Horn, T. Conversion of Pro-Inflammatory Murine Alox5 into an Anti-Inflammatory 15S-Lipoxygenating Enzyme by Multiple Mutations of Sequence Determinants. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2013**, 530 (1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2012.11.015>.
- (71) Wang, D.; Dubois, R. N. Eicosanoids and Cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **2010**, 10 (3), 181–193. <https://doi.org/10.1038/NRC2809>.

- (72) Schneider, C.; Pozzi, A. Cyclooxygenases and Lipoxygenases in Cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, **2011**, 30 (0), 277. <https://doi.org/10.1007/S10555-011-9310-3>.
- (73) Ryan, A.; Godson, C. Lipoxins: Regulators of Resolution. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2010**, 10 (2), 166–172. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2010.02.005>.
- (74) Tavakoli-Yaraki, M.; Karami-Tehrani, F.; Salimi, V.; Sirati-Sabet, M. Induction of Apoptosis by Trichostatin A in Human Breast Cancer Cell Lines: Involvement of 15-Lox-1. *Tumour Biol.*, **2013**, 34 (1), 241–249. <https://doi.org/10.1007/S13277-012-0544-7>.
- (75) Wen, Z.; Liu, H.; Li, M.; Li, B.; Gao, W.; Shao, Q.; Fan, B.; Zhao, F.; Wang, Q.; Xie, Q.; Yang, Y.; Yu, J.; Qu, X. Increased Metabolites of 5-Lipoxygenase from Hypoxic Ovarian Cancer Cells Promote Tumor-Associated Macrophage Infiltration. *Oncogene*, **2015**, 34 (10), 1241–1252. <https://doi.org/10.1038/ONC.2014.85>.
- (76) Roffeis, J.; Hornung, D.; Kuhn, H.; Walther, M. 15-Lipoxygenase-2 Is Differentially Expressed in Normal and Neoplastic Ovary. *Eur. J. Cancer Prev.*, **2007**, 16 (6), 568–575. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0B013E32801023C4>.
- (77) Celenk, F.; Bayramoglu, I.; Yilmaz, A.; Menevse, A.; Bayazit, Y. Expression of Cyclooxygenase-2, 12-Lipoxygenase, and Inducible Nitric Oxide Synthase in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J. Craniofac. Surg.*, **2013**, 24 (4), 1114–1117. <https://doi.org/10.1097/SCS.0B013E31828F2491>.
- (78) Faronato, M.; Muzzonigro, G.; Milanese, G.; Menna, C.; Bonfigli, A. R.; Catalano, A.; Procopio, A. Increased Expression of 5-Lipoxygenase Is Common in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Histol. Histopathol.*, **2007**, 22 (10), 1109–1118. <https://doi.org/10.14670/HH-22.1109>.
- (79) Hayashi, T.; Nishiyama, K.; Shirahama, T. Inhibition of 5-Lipoxygenase Pathway Suppresses the Growth of Bladder Cancer Cells. *Int. J. Urol.*, **2006**, 13 (8), 1086–1091. <https://doi.org/10.1111/J.1442-2042.2006.01485.X>.
- (80) Kamitani, H.; Geller, M.; Eling, T. Expression of 15-Lipoxygenase by Human Colorectal Carcinoma Caco-2 Cells during Apoptosis and Cell Differentiation. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273 (34), 21569–21577. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.34.21569>.
- (81) Reddy, N.; Everhart, A.; Eling, T.; Glasgow, W. Characterization of a 15-Lipoxygenase in Human Breast Carcinoma BT-20 Cells: Stimulation of 13-HODE Formation by TGF α /EGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, 231 (1), 111–116. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1997.6048>.

- (82) Spindler, S. A.; Sarkar, F. H.; Sakr, W. A.; Blackburn, M. L.; Bull, A. W.; Lagattuta, M.; Reddy, R. G. Production of 13-Hydroxyoctadecadienoic Acid (13-HODE) by Prostate Tumors and Cell Lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, 239 (3), 775–781. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1997.7471>.
- (83) DuBois, R. N. Leukotriene A4 Signaling, Inflammation, and Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, **2003**, 95 (14), 1028–1029. <https://doi.org/10.1093/JNCI/95.14.1028>.
- (84) Nie, D.; Hillman, G. G.; Geddes, T.; Tang, K.; Pierson, C.; Grignon, D. J.; Honn, K. V. Platelet-Type 12-Lipoxygenase in a Human Prostate Carcinoma Stimulates Angiogenesis and Tumor Growth. *Cancer Res.*, **1998**, 58 (18), 4047–4051.
- (85) Shureiqi, I.; Jiang, W.; Zuo, X.; Wu, Y.; Stimmel, J. B.; Leesnitzer, L. M.; Morris, J. S.; Fan, H. Z.; Fischer, S. M.; Lippman, S. M. The 15-Lipoxygenase-1 Product 13-S-Hydroxyoctadecadienoic Acid down-Regulates PPAR-Delta to Induce Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2003**, 100 (17), 9968–9973. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1631086100>.
- (86) Zhao, L.; Funk, C. D. Lipoxygenase Pathways in Atherogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.*, **2004**, 14 (5), 191–195. <https://doi.org/10.1016/J.TCM.2004.04.003>.
- (87) Wittwer, J.; Hersberger, M. The Two Faces of the 15-Lipoxygenase in Atherosclerosis. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids*, **2007**, 77 (2), 67–77. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2007.08.001>.
- (88) Poeckel, D.; Funk, C. D. The 5-Lipoxygenase/Leukotriene Pathway in Preclinical Models of Cardiovascular Disease. *Cardiovasc. Res.*, **2010**, 86 (2), 243–253. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVQ016>.
- (89) Wuest, S. J. A.; Horn, T.; Marti-Jaun, J.; Kühn, H.; Hersberger, M. Association of Polymorphisms in the ALOX15B Gene with Coronary Artery Disease. *Clin. Biochem.*, **2014**, 47 (6), 349–355. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2013.12.013>.
- (90) Chawengsub, Y.; Gauthier, K. M.; Campbell, W. B. Role of Arachidonic Acid Lipoxygenase Metabolites in the Regulation of Vascular Tone. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, **2009**, 297 (2), H495. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00349.2009>.
- (91) Qiu, H.; Gabrielsen, A.; Agardh, H. E.; Wan, M.; Wetterholm, A.; Wong, C. H.; Hedin, U.; Swedenborg, J.; Hansson, G. K.; Samuelsson, B.; Paulsson-Berne, G.; Haeggström, J. Z. Expression of 5-Lipoxygenase and Leukotriene A4 Hydrolase in Human Atherosclerotic Lesions Correlates with Symptoms of Plaque Instability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2006**, 103 (21), 8161–8166. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0602414103>.

- (92) Singh, R. K.; Tandon, R.; Dastidar, S. G.; Ray, A. A Review on Leukotrienes and Their Receptors with Reference to Asthma. *J. Asthma*, **2013**, 50 (9), 922–931. <https://doi.org/10.3109/02770903.2013.823447>.
- (93) Çobanoğlu, B.; Toskala, E.; Ural, A.; Cingi, C. Role of Leukotriene Antagonists and Antihistamines in the Treatment of Allergic Rhinitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **2013**, 13 (2), 203–208. <https://doi.org/10.1007/S11882-013-0341-4>.
- (94) Gane, J.; Buckley, R. Leukotriene Receptor Antagonists in Allergic Eye Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, **2013**, 1 (1), 65–74. <https://doi.org/10.1016/J.JAIP.2012.07.001>.
- (95) Czapski, G. A.; Czubowicz, K.; Strosznajder, J. B.; Strosznajder, R. P. The Lipoxygenases: Their Regulation and Implication in Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.*, **2016**, 41 (1–2), 243–257. <https://doi.org/10.1007/S11064-015-1776-X>.
- (96) Praticò, D.; Zhukareva, V.; Yao, Y.; Uryu, K.; Funk, C. D.; Lawson, J. A.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y. 12/15-Lipoxygenase Is Increased in Alzheimer's Disease: Possible Involvement in Brain Oxidative Stress. *Am. J. Pathol.*, **2004**, 164 (5), 1655–1662. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63724-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63724-8).
- (97) Kühn, H.; Belkner, J.; Wiesner, R.; Alder, L. Occurrence of 9- and 13-Keto-Octadecadienoic Acid in Biological Membranes Oxygenated by the Reticulocyte Lipoxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1990**, 279 (2), 218–224. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90484-G](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90484-G).
- (98) Krieg, P.; Rosenberger, S.; De Juanes, S.; Latzko, S.; Hou, J.; Dick, A.; Kloz, U.; Van Der Hoeven, F.; Hausser, I.; Esposito, I.; Rauh, M.; Schneider, H. Aloxe3 Knockout Mice Reveal a Function of Epidermal Lipoxygenase-3 as Hepoxilin Synthase and Its Pivotal Role in Barrier Formation. *J. Invest. Dermatol.*, **2013**, 133 (1), 172–180. <https://doi.org/10.1038/JID.2012.250>.
- (99) Epp, N.; Fürstenberger, G.; Müller, K.; De Juanes, S.; Leitges, M.; Hausser, I.; Thieme, F.; Liebisch, G.; Schmitz, G.; Krieg, P. 12R-Lipoxygenase Deficiency Disrupts Epidermal Barrier Function. *J. Cell Biol.*, **2007**, 177 (1), 173–182. <https://doi.org/10.1083/JCB.200612116>.
- (100) Miyamoto, T.; Ogino, N.; Yamamoto, S.; Hayaishi, O. Purification of Prostaglandin Endoperoxide Synthetase from Bovine Vesicular Gland Microsomes. *J. Biol. Chem.*, **1976**, 251 (9), 2629–2636. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33534-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33534-2).
- (101) DeWitt, D. L.; Smith, W. L. Primary Structure of Prostaglandin G/H Synthase from Sheep Vesicular Gland Determined from the Complementary DNA Sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1988**, 85 (5), 1412–1416. <https://doi.org/10.1073/PNAS.85.5.1412>.

- (102) Smith, W. L.; DeWitt, D. L.; Garavito, R. M. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu. Rev. Biochem.*, **2000**, 69, 145–182. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.69.1.145>.
- (103) Marnett, L. J.; Maddipati, K. *Peroxidases in Chemistry and Biology*; Grisham, M.; Everse, J.; Everse, K., Eds.; CRC Press, **1991**; pp 293–334.
- (104) Smith, W. L.; Marnett, L. J. Prostaglandin Endoperoxide Synthase: Structure and Catalysis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, 1083 (1), 1–17. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90119-3](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90119-3).
- (105) Smith, W. L.; Urade, Y.; Jakobsson, P. J. Enzymes of the Cyclooxygenase Pathways of Prostanoid Biosynthesis. *Chem. Rev.*, **2011**, 111 (10), 5821–5865. <https://doi.org/10.1021/CR2002992>.
- (106) Dong, L.; Sharma, N. P.; Jurban, B. J.; Smith, W. L. Pre-Existent Asymmetry in the Human Cyclooxygenase-2 Sequence Homodimer. *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288 (40), 28641–28655. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.505503>.
- (107) Dong, L.; Vecchio, A. J.; Sharma, N. P.; Jurban, B. J.; Malkowski, M. G.; Smith, W. L. Human Cyclooxygenase-2 Is a Sequence Homodimer That Functions as a Conformational Heterodimer. *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286 (21), 19035–19046. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.231969>.
- (108) Kudalkar, S. N.; Nikas, S. P.; Kingsley, P. J.; Xu, S.; Galligan, J. J.; Rouzer, C. A.; Banerjee, S.; Ji, L.; Eno, M. R.; Makriyannis, A.; Marnett, L. J. 13-Methylarachidonic Acid Is a Positive Allosteric Modulator of Endocannabinoid Oxygenation by Cyclooxygenase. *J. Biol. Chem.*, **2015**, 290 (12), 7897–7909. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.634014>.
- (109) Kulmacz, R. J.; Lands, W. E. Prostaglandin H Synthase. Stoichiometry of Heme Cofactor. *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259 (10), 6358–6363. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)82149-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)82149-8).
- (110) Kulmacz, R. J.; Lands, W. E. M. Stoichiometry and Kinetics of the Interaction of Prostaglandin H Synthase with Anti-Inflammatory Agents. *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260 (23), 12572–12578. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38909-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38909-3).
- (111) Mitchener, M. M.; Hermanson, D. J.; Shockley, E. M.; Brown, H. A.; Lindsley, C. W.; Reese, J.; Rouzer, C. A.; Lopez, C. F.; Marnett, L. J.; Marletta, M. A. Competition and Allostery Govern Substrate Selectivity of Cyclooxygenase-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2015**, 112 (40), 12366–12371. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1507307112/-/DCSUPPLEMENTAL>.

- (112) Rimon, G.; Sidhu, R. S.; Lauver, D. A.; Lee, J. Y.; Sharma, N. P.; Yuan, C.; Frieler, R. A.; Trievel, R. C.; Lucchesi, B. R.; Smith, W. L. Coxibs Interfere with the Action of Aspirin by Binding Tightly to One Monomer of Cyclooxygenase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2010**, 107 (1), 28–33. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0909765106>.
- (113) Sidhu, R. S.; Lee, J. Y.; Yuan, C.; Smith, W. L. Comparison of Cyclooxygenase-1 Crystal Structures: Cross-Talk between Monomers Comprising Cyclooxygenase-1 Homodimers. *Biochemistry*, **2010**, 49 (33), 7069–7079. <https://doi.org/10.1021/BI1003298>.
- (114) Yuan, C.; Sidhu, R. S.; Kuklev, D. V.; Kado, Y.; Wada, M.; Song, I.; Smith, W. L. Cyclooxygenase Allosterism, Fatty Acid-Mediated Cross-Talk between Monomers of Cyclooxygenase Homodimers. *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284 (15), 10046. <https://doi.org/10.1074/JBC.M808634200>.
- (115) Gimenez-Bastida, J. A.; Boeglin, W. E.; Boutaud, O.; Malkowski, M. G.; Schneider, C. Residual Cyclooxygenase Activity of Aspirin-Acetylated COX-2 Forms 15 R-Prostaglandins That Inhibit Platelet Aggregation. *FASEB J.*, **2019**, 33 (1), 1033–1041. <https://doi.org/10.1096/FJ.201801018R>.
- (116) Dong, L.; Zou, H.; Yuan, C.; Hong, Y. H.; Uhlson, C. L.; Murphy, R. C.; Smith, W. L. Interactions of 2-O-Arachidonylglycerol Ether and Ibuprofen with the Allosteric and Catalytic Subunits of Human COX-2. *J. Lipid Res.*, **2016**, 57 (6), 1043–1050. <https://doi.org/10.1194/JLR.M067512>.
- (117) Liu, X.; Moon, S. H.; Jenkins, C. M.; Sims, H. F.; Gross, R. W. Cyclooxygenase-2 Mediated Oxidation of 2-Arachidonoyl-Lysophospholipids Identifies Unknown Lipid Signaling Pathways. *Cell Chem. Biol.*, **2016**, 23 (10), 1217–1227. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2016.08.009>.
- (118) Prusakiewicz, J. J.; Kingsley, P. J.; Kozak, K. R.; Marnett, L. J. Selective Oxygenation of N-Arachidonylglycine by Cyclooxygenase-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2002**, 296 (3), 612–617. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00915-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00915-4).
- (119) Prusakiewicz, J. J.; Turman, M. V.; Vila, A.; Ball, H. L.; Al-Mestarihi, A. H.; Marzo, V. Di; Marnett, L. J. Oxidative Metabolism of Lipoamino Acids and Vanilloids by Lipoxygenases and Cyclooxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2007**, 464 (2), 260–268. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2007.04.007>.
- (120) Rouzer, C. A.; Marnett, L. J. Mechanism of Free Radical Oxygenation of Polyunsaturated Fatty Acids by Cyclooxygenases. *Chem. Rev.*, **2003**, 103 (6), 2239–2304. <https://doi.org/10.1021/CR000068X>.

- (121) Garavito, R. M.; Mulichak, A. M. The Structure of Mammalian Cyclooxygenases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2003**, 32, 183–206. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOPHYS.32.110601.141906>.
- (122) Blobaum, A. L.; Marnett, L. J. Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition. *J. Med. Chem.*, **2007**, 50 (7), 1425–1441. <https://doi.org/10.1021/JM0613166>.
- (123) Smith, W. L.; Langenbach, R. Why There Are Two Cyclooxygenase Isozymes. *J. Clin. Invest.*, **2001**, 107 (12), 1491. <https://doi.org/10.1172/JCI13271>.
- (124) Rouzer, C. A.; Marnett, L. J. Structural and Chemical Biology of the Interaction of Cyclooxygenase with Substrates and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Chem. Rev.*, **2020**, 120 (15), 7592–7641. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.0C00215/SUPPL_FILE/CR0C00215_SI_001.PDF.
- (125) Picot, D.; Loll, P. J.; Garavito, R. M. The X-Ray Crystal Structure of the Membrane Protein Prostaglandin H2 Synthase-1. *Nature*, **1994**, 367 (6460), 243–249. <https://doi.org/10.1038/367243a0>.
- (126) Smith, W. L.; Dewitt, D. L. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases-1 and -2. *Adv. Immunol.*, **1996**, 62, 167–215. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60430-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60430-7).
- (127) Vecchio, A. J.; Simmons, D. M.; Malkowski, M. G. Structural Basis of Fatty Acid Substrate Binding to Cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285 (29), 22152–22163. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.119867/ATTACHMENT/9A00474D-0B64-4C45-AA44-93A831D0F440/MMC1.PDF>.
- (128) Bhattacharyya, D. K.; Lecomte, M.; Rieke, C. J.; Garavito, R. M.; Smith, W. L. Involvement of Arginine 120, Glutamate 524, and Tyrosine 355 in the Binding of Arachidonate and 2-Phenylpropionic Acid Inhibitors to the Cyclooxygenase Active Site of Ovine Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271 (4), 2179–2184. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.4.2179>.
- (129) Furse, K. E.; Corcelli, S. A. Molecular Dynamics Simulations of DNA Solvation Dynamics. *J. Phys. Chem. Lett.*, **2010**, 1 (12), 1813–1820. <https://doi.org/10.1021/JZ100485E>.
- (130) Malkowski, M. G.; Thuresson, E. D.; Lakkides, K. M.; Rieke, C. J.; Micielli, R.; Smith, W. L.; Garavito, R. M. Structure of Eicosapentaenoic and Linoleic Acids in the Cyclooxygenase Site of Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276 (40), 37547–37555. <https://doi.org/10.1074/JBC.M105982200>.
- (131) Malkowski, M. G.; Ginell, S. L.; Smith, W. L.; Garavito, R. M. The Productive Conformation of Arachidonic Acid Bound to Prostaglandin Synthase. *Science*, **2000**, 289 (5486), 1933–1937. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.289.5486.1933>.

- (132) Thuresson, E. D.; Malkowski, M. G.; Lakkides, K. M.; Rieke, C. J.; Mulichak, A. M.; Ginell, S. L.; Garavito, R. M.; Smith, W. L. Mutational and X-Ray Crystallographic Analysis of the Interaction of Dihomo-Gamma -Linolenic Acid with Prostaglandin Endoperoxide H Synthases. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276 (13), 10358–10365. <https://doi.org/10.1074/JBC.M009378200>.
- (133) Michael Garavito, R.; Malkowski, M. G.; DeWitt, D. L. The Structures of Prostaglandin Endoperoxide H Synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **2002**, 68–69, 129–152. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00026-6).
- (134) Thuresson, E. D.; Lakkides, K. M.; Rieke, C. J.; Sun, Y.; Wingerd, B. A.; Micielli, R.; Mulichak, A. M.; Malkowski, M. G.; Garavito, R. M.; Smith, W. L. Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1: The Functions of Cyclooxygenase Active Site Residues in the Binding, Positioning, and Oxygenation of Arachidonic Acid. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276 (13), 10347–10357. <https://doi.org/10.1074/JBC.M009377200>.
- (135) Kozak, K. R.; Rowlinson, S. W.; Marnett, L. J. Oxygenation of the Endocannabinoid, 2-Arachidonylglycerol, to Glyceryl Prostaglandins by Cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275 (43), 33744–33749. <https://doi.org/10.1074/JBC.M007088200>.
- (136) Turman, M. V.; Kingsley, P. J.; Rouzer, C. A.; Cravatt, B. F.; Marnett, L. J. Oxidative Metabolism of a Fatty Acid Amide Hydrolase-Regulated Lipid, Arachidonoyltaurine. *Biochemistry*, **2008**, 47 (12), 3917–3925. <https://doi.org/10.1021/BI702530Z>.
- (137) Kiefer, J. R.; Pawiutz, J. L.; Moreland, K. T.; Stegeman, R. A.; Hood, W. F.; Glerse, J. K.; Stevens, A. M.; Goodwin, D. C.; Rowlinson, S. W.; Marnett, L. J.; Stallings, W. C.; Kurumbail, R. G. Structural Insights into the Stereochemistry of the Cyclooxygenase Reaction. *Nature*, **2000**, 405 (6782), 97–101. <https://doi.org/10.1038/35011103>.
- (138) Goldblatt, M. W. A Depressor Substance in Seminal Fluid. *J. Soc. Chem. Ind.*, **1933**, 52, 1056–1057.
- (139) Chandrasekharan, N. V.; Simmons, D. L. The Cyclooxygenases. *Genome Biol.*, **2004**, 5 (9), 241. <https://doi.org/10.1186/GB-2004-5-9-241>.
- (140) Funk, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science*, **2001**, 294 (5548), 1871–1875. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.294.5548.1871>.
- (141) Smith, W. Molecular Biology of Prostanoid Biosynthetic Enzymes and Receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1997**, 400B, 989–1011.

- (142) Smyth, E. M.; Grosser, T.; Wang, M.; Yu, Y.; FitzGerald, G. A. Prostanoids in Health and Disease. *J. Lipid Res.*, **2009**, 50 (Suppl), S423-S428. <https://doi.org/10.1194/JLR.R800094-JLR200>.
- (143) Ricciotti, E.; Fitzgerald, G. A. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2011**, 31 (5), 986–1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>.
- (144) Moncada, S.; Vane, J. R. The Role of Prostacyclin in Vascular Tissue. *Fed. Proc.*, **1979**, 38 (1), 66–71.
- (145) Katagiri, H.; Ito, Y.; Ishii, K. I.; Hayashi, I.; Suematsu, M.; Yamashina, S.; Murata, T.; Narumiya, S.; Kakita, A.; Majima, M. Role of Thromboxane Derived from COX-1 and -2 in Hepatic Microcirculatory Dysfunction during Endotoxemia in Mice. *Hepatology*, **2004**, 39 (1), 139–150. <https://doi.org/10.1002/HEP.20000>.
- (146) Nandakishore, R.; Yalavarthi, P.; Kiran, Y.; Rajapranathi, M. Selective Cyclooxygenase Inhibitors: Current Status. *Curr. Drug Discov. Technol.*, **2014**, 11 (2), 127–132. <https://doi.org/10.2174/1570163811666140127123717>.
- (147) Kirkby, N. S.; Zaiss, A. K.; Urquhart, P.; Jiao, J.; Austin, P. J.; Al-Yamani, M.; Lundberg, M. H.; MacKenzie, L. S.; Warner, T. D.; Nicolaou, A.; Herschman, H. R.; Mitchell, J. A. LC-MS/MS Confirms That COX-1 Drives Vascular Prostacyclin Whilst Gene Expression Pattern Reveals Non-Vascular Sites of COX-2 Expression. *PLoS One*, **2013**, 8 (7), e69524. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0069524>.
- (148) Amateau, S. K.; McCarthy, M. M. Induction of PGE2 by Estradiol Mediates Developmental Masculinization of Sex Behavior. *Nat. Neurosci.*, **2004**, 7 (6), 643–650. <https://doi.org/10.1038/NN1254>.
- (149) Ahmetaj-Shala, B.; Kirkby, N. S.; Knowles, R.; Al'Yamani, M.; Mazi, S.; Wang, Z.; Tucker, A. T.; Mackenzie, L.; Armstrong, P. C. J.; Nüsing, R. M.; Tomlinson, J. A. P.; Warner, T. D.; Leiper, J.; Mitchell, J. A. Evidence That Links Loss of Cyclooxygenase-2 with Increased Asymmetric Dimethylarginine: Novel Explanation of Cardiovascular Side Effects Associated with Anti-Inflammatory Drugs. *Circulation*, **2015**, 131 (7), 633–642. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011591>.
- (150) Wallace, J. L.; McKnight, W.; Reuter, B. K.; Vergnolle, N. NSAID-Induced Gastric Damage in Rats: Requirement for Inhibition of Both Cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*, **2000**, 119 (3), 706–714. <https://doi.org/10.1053/GAST.2000.16510>.
- (151) Burdan, F.; Chalas, A.; Szumilo, J. Cyclooxygenase and Prostanoids - Biological Implications. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **2006**, 60, 129–141.

- (152) Williams, C. S.; Mann, M.; DuBois, R. N. The Role of Cyclooxygenases in Inflammation, Cancer, and Development. *Oncogene*, **1999**, 18 (55), 7908–7916. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1203286>.
- (153) Rizzo, M. T. Cyclooxygenase-2 in Oncogenesis. *Clin. Chim. Acta.*, **2011**, 412 (9–10), 671–687. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2010.12.026>.
- (154) Folkman, J. Angiogenesis in Cancer, Vascular, Rheumatoid and Other Disease. *Nat. Med.*, **1995**, 1 (1), 27–30. <https://doi.org/10.1038/nm0195-27>.
- (155) Wong, R. S. Y. Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **2011**, 30 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87/TABLES/3>.
- (156) Pasinetti, G. M. Cyclooxygenase and Inflammation in Alzheimer's Disease: Experimental Approaches and Clinical Intervention. *J. Neurosci. Res.*, **1998**, 54, 1–6. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19981001\)54:1<1::AID-JNR1>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19981001)54:1<1::AID-JNR1>3.0.CO;2-M)
- (157) Hinz, B.; Brune, K. Cyclooxygenase-2--10 Years Later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002**, 300 (2), 367–375. <https://doi.org/10.1124/JPET.300.2.367>.
- (158) Schonbeck, U.; Sukhova, G. K.; Graber, P.; Coulter, S.; Libby, P. Augmented Expression of Cyclooxygenase-2 in Human Atherosclerotic Lesions. *Am. J. Pathol.*, **1999**, 155 (4), 1281–1291. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65230-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65230-3).
- (159) Vane, J. R. The Fight against Rheumatism: From Willow Bark to Cox-1 Sparing Drugs. *J. Physiol. Pharmacol.*, **2000**, 51, 573–586.
- (160) Brune, K.; Hinz, B. The Discovery and Development of Antiinflammatory Drugs. *Arthritis Rheum.*, **2004**, 50 (8), 2391–2399. <https://doi.org/10.1002/ART.20424>.
- (161) Ferreira, S. H.; Moncada, S.; Vane, J. R. Indomethacin and Aspirin Abolish Prostaglandin Release from the Spleen. *Nat. New Biol.*, 1971, 231 (25), 237–239. <https://doi.org/10.1038/newbio231237a0>.
- (162) Smith, J. B.; Willis, A. L. Aspirin Selectively Inhibits Prostaglandin Production in Human Platelets. *Nat. New Biol.*, **1971**, 231 (25), 235–237. <https://doi.org/10.1038/NEWBIO231235A0>.
- (163) Vane, J. R. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. *Nat. New Biol.*, **1971**, 231 (25), 232–235. <https://doi.org/10.1038/newbio231232a0>.
- (164) Tanaka, A.; Araki, H.; Komoike, Y.; Hase, S.; Takeuchi, K. Inhibition of Both COX-1 and COX-2 Is Required for Development of Gastric Damage in Response to Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *J. Physiol. Paris*, **2001**, 95 (1–6), 21–27. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(01\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(01)00005-5).

- (165) Tanaka, A.; Hase, S.; Miyazawa, T.; Takeuchi, K. Up-Regulation of Cyclooxygenase-2 by Inhibition of Cyclooxygenase-1: A Key to Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Intestinal Damage. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002**, 300 (3), 754–761. <https://doi.org/10.1124/JPET.300.3.754>.
- (166) Kurumbail, R. G.; Stevens, A. M.; Gierse, J. K.; McDonald, J. J.; Stegeman, R. A.; Pak, J. Y.; Gildehaus, D.; Miyashiro, J. M.; Penning, T. D.; Seibert, K.; Isakson, P. C.; Stallings, W. C. Structural Basis for Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Anti-Inflammatory Agents. *Nature*, **1996**, 384 (6610), 644–648. <https://doi.org/10.1038/384644A0>.
- (167) Batlouni, M. Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales. *Arq. Bras. Cardiol.*, **2010**, 94 (4), 556–563. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010000400019>.
- (168) FitzGerald, G. A.; Patrono, C. The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. *N. Engl. J. Med.*, **2001**, 345 (6), 433–442. <https://doi.org/10.1056/NEJM200108093450607>.
- (169) Abraham, N. S.; El-Serag, H. B.; Hartman, C.; Richardson, P.; Deswal, A. Cyclooxygenase-2 Selectivity of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and the Risk of Myocardial Infarction and Cerebrovascular Accident. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **2007**, 25 (8), 913–924. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2036.2007.03292.X>.
- (170) Bhatt, D. L.; Scheiman, J.; Abraham, N. S.; Antman, E. M.; Chan, F. K. L.; Furberg, C. D.; Johnson, D. A.; Mahaffey, K. W.; Quigley, E. M.; Harrington, R. A.; Bates, E. R.; Bridges, C. R.; Eisenberg, M. J.; Ferrari, V. A.; Hlatky, M. A.; Kaul, S.; Lindner, J. R.; Moliterno, D. J.; Mukherjee, D.; Schofield, R. S.; Rosenson, R. S.; Stein, J. H.; Weitz, H. H.; Wesley, D. J. ACCF/ACG/AHA 2008 Expert Consensus Document on Reducing the Gastrointestinal Risks of Antiplatelet Therapy and NSAID Use: A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. *Circulation*, **2008**, 118 (18), 1894–1909. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191087>.
- (171) Arber, N.; Eagle, C. J.; Spicak, J.; Rácz, I.; Dite, P.; Hajer, J.; Zavoral, M.; Lechuga, M. J.; Gerletti, P.; Tang, J.; Rosenstein, R. B.; Macdonald, K.; Bhadra, P.; Fowler, R.; Wittes, J.; Zauber, A. G.; Solomon, S. D.; Levin, B. Celecoxib for the Prevention of Colorectal Adenomatous Polyps. *N. Engl. J. Med.*, **2006**, 355 (9), 885–895. <https://doi.org/10.1056/NEJM0A061652>.
- (172) Arenas, C.; Peña, L.; Granados-Soler, J. L.; Pérez-Alenza, M. D. Adjuvant Therapy for Highly Malignant Canine Mammary Tumours: Cox-2 Inhibitor versus Chemotherapy: A Case-Control Prospective Study. *Vet. Rec.*, **2016**, 179 (5), 125. <https://doi.org/10.1136/VR.103398>.

- (173) Cancedda, S.; Sabattini, S.; Bettini, G.; Leone, V. F.; Laganga, P.; Rossi, F.; Terragni, R.; Gnudi, G.; Vignoli, M. Combination of Radiation Therapy and Firocoxib for the Treatment of Canine Nasal Carcinoma. *Vet. Radiol. Ultrasound*, **2015**, 56 (3), 335–343. <https://doi.org/10.1111/VRU.12246>.
- (174) Edelman, M. J.; Watson, D.; Wang, X.; Morrison, C.; Kratzke, R. A.; Jewell, S.; Hodgson, L.; Mauer, A. M.; Gajra, A.; Masters, G. A.; Bedor, M.; Vokes, E. E.; Green, M. J. Eicosanoid Modulation in Advanced Lung Cancer: Cyclooxygenase-2 Expression Is a Positive Predictive Factor for Celecoxib + Chemotherapy-- Cancer and Leukemia Group B Trial 30203. *J. Clin. Oncol.*, **2008**, 26 (6), 848–855. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.8081>.
- (175) Iturriaga, M. P.; Paredes, R.; Arias, J. I.; Torres, C. G. Meloxicam Decreases the Migration and Invasion of CF41.Mg Canine Mammary Carcinoma Cells. *Oncol. Lett.*, **2017**, 14 (2), 2198–2206. <https://doi.org/10.3892/OL.2017.6400>.
- (176) Vahidi, R.; Safi, S.; Farsinejad, A.; Panahi, N. Citrate and Celecoxib Induce Apoptosis and Decrease Necrosis in Synergistic Manner in Canine Mammary Tumor Cells. *Cell. Mol. Biol.*, 2015, 61 (5), 22–28. <https://doi.org/10.14715/cmb/2015.61.5.4>.
- (177) Howard, P. A.; Delafontaine, P. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Cardiovascular Risk. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2004**, 43 (4), 519–525. <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2003.09.043>.
- (178) Kirkby, N. S.; Lundberg, M. H.; Harrington, L. S.; Leadbeater, P. D. M.; Milne, G. L.; Potter, C. M. F.; Al-Yamani, M.; Adeyemi, O.; Warner, T. D.; Mitchell, J. A. Cyclooxygenase-1, Not Cyclooxygenase-2, Is Responsible for Physiological Production of Prostacyclin in the Cardiovascular System. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2012**, 109 (43), 17597–17602. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1209192109>.
- (179) Crescente, M.; Armstrong, P. C.; Chan, M. V; Edin, M. L.; Lih, F. B.; Jiao, J.; Gaston-Massuet, C.; Cottrell, G.; Kirkby, N.; Mitchell, J.; Zeldin, D.; Herschman, H.; Warner, T. D. Platelet Cox-1 Knockout Mouse as a Model of the Effects of Aspirin in the Cardiovascular System. *Heart*, **2017**, 103 (Suppl 5), A108–A109. <https://doi.org/10.1136/HEARTJNL-2017-311726.146>.
- (180) Gum, P. A.; Kottke-Marchant, K.; Poggio, E. D.; Gurm, H.; Welsh, P. A.; Brooks, L.; Sapp, S. K.; Topol, E. J. Profile and Prevalence of Aspirin Resistance in Patients with Cardiovascular Disease. *Am. J. Cardiol.*, **2001**, 88 (3), 230–235. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(01\)01631-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(01)01631-9).

- (181) Macdonald, T. M.; Hawkey, C. J.; Ford, I.; McMurray, J. J. V.; Scheiman, J. M.; Hallas, J.; Findlay, E.; Grobbee, D. E.; Hobbs, F. D. R.; Ralston, S. H.; Reid, D. M.; Walters, M. R.; Webster, J.; Ruschitzka, F.; Ritchie, L. D.; Perez-Gutthann, S.; Connolly, E.; Greenlaw, N.; Wilson, A.; Wei, L.; Mackenzie, I. S. Randomized Trial of Switching from Prescribed Non-Selective Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs to Prescribed Celecoxib: The Standard Care vs. Celecoxib Outcome Trial (SCOT). *Eur. Heart J.*, **2017**, 38 (23), 1843–1850. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHW387>.
- (182) Nissen, S. E.; Yeomans, N. D.; Solomon, D. H.; Lüscher, T. F.; Libby, P.; Husni, M. E.; Graham, D. Y.; Borer, J. S.; Wisniewski, L. M.; Wolski, K. E.; Wang, Q.; Menon, V.; Ruschitzka, F.; Gaffney, M.; Beckerman, B.; Berger, M. F.; Bao, W.; Lincoff, A. M. Cardiovascular Safety of Celecoxib, Naproxen, or Ibuprofen for Arthritis. *N. Engl. J. Med.*, **2016**, 375 (26), 2519–2529. <https://doi.org/10.1056/NEJMORA1611593>.
- (183) Scarpignato, C.; Lanus, A.; Blandizzi, C.; Lems, W. F.; Hermann, M.; Hunt, R. H. Safe Prescribing of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Patients with Osteoarthritis--an Expert Consensus Addressing Benefits as Well as Gastrointestinal and Cardiovascular Risks. *BMC Med.*, **2015**, 13 (1), 55. <https://doi.org/10.1186/S12916-015-0285-8>.
- (184) Garcia Rodriguez, L. A.; Cea-Soriano, L.; Tacconelli, S.; Patrignani, P. Coxibs: Pharmacology, Toxicity and Efficacy in Cancer Clinical Trials. *Recent Results Cancer Res.*, **2013**, 191, 67–93. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30331-9_4.
- (185) Velema, W. A.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Photopharmacology: Beyond Proof of Principle. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136 (6), 2178–2191. <https://doi.org/10.1021/JA413063E>.
- (186) Hüll, K.; Morstein, J.; Trauner, D. In Vivo Photopharmacology. *Chem. Rev.*, **2018**, 118 (21), 10710–10747. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.8B00037>.
- (187) Hammerich, M.; Schütt, C.; Stähler, C.; Lentès, P.; Röhricht, F.; Höppner, R.; Herges, R. Heterodiazocines: Synthesis and Photochromic Properties, Trans to Cis Switching within the Bio-Optical Window. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138 (40), 13111–13114. https://doi.org/10.1021/JACS.6B05846/SUPPL_FILE/JA6B05846_SI_002.AVI.
- (188) Lentès, P.; Stadler, E.; Röhricht, F.; Brahms, A.; Gröbner, J.; Sönnichsen, F. D.; Gescheidt, G.; Herges, R. Nitrogen Bridged Diazocines: Photochromes Switching within the Near-Infrared Region with High Quantum Yields in Organic Solvents and in Water. *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, 141 (34), 13592–13600. https://doi.org/10.1021/JACS.9B06104/SUPPL_FILE/JA9B06104_SI_003.AVI.

- (189) Hansen, M. J.; Lerch, M. M.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Direct and Versatile Synthesis of Red-Shifted Azobenzenes. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2016**, 55 (43), 13514–13518. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201607529>.
- (190) Göppert-Mayer, M. Über Elementarakte Mit Zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.*, **1931**, 401 (3), 273–294. <https://doi.org/10.1002/ANDP.19314010303>.
- (191) Kaiser, W.; Garrett, C. G. B. Two-Photon Excitation in CaF₂: Eu²⁺. *Phys. Rev. Lett.*, **1961**, 7 (6), 229–230. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.7.229>.
- (192) Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2003**, 32, 335–373. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOPHYS.32.110601.142532>.
- (193) Huang, S. Y.; Zou, X. Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *Int. J. Mol. Sci.*, **2010**, 11 (8), 3016–3034. <https://doi.org/10.3390/IJMS11083016>.
- (194) Ewing, T. J. A.; Makino, S.; Skillman, A. G.; Kuntz, I. D. DOCK 4.0: Search Strategies for Automated Molecular Docking of Flexible Molecule Databases. *J. Comput. Mol. Des.*, **2001**, 15 (5), 411–428. <https://doi.org/10.1023/A:1011115820450>.
- (195) Wu, G.; Robertson, D. H.; Brooks, C. L.; Vieth, M. Detailed Analysis of Grid-Based Molecular Docking: A Case Study of CDOCKER-A CHARMM-Based MD Docking Algorithm. *J. Comput. Chem.*, **2003**, 24 (13), 1549–1562. <https://doi.org/10.1002/JCC.10306>.
- (196) Clark, D. E.; Westhead, D. R. Evolutionary Algorithms in Computer-Aided Molecular Design. *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **1996**, 10 (4), 337–358. <https://doi.org/10.1007/BF00124503>.
- (197) Mannhold, R.; Kubinyi, H.; Timmerman, H.; Clark, D. E. *Evolutionary Algorithms in Molecular Design*; Wiley-VCH, **2008**.
- (198) Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. *Proteins*, **2003**, 52 (4), 609–623. <https://doi.org/10.1002/PROT.10465>.
- (199) Changeux, J. P.; Edelman, S. Conformational Selection or Induced Fit? 50 Years of Debate Resolved. *F1000 Biol. Rep.*, **2011**, 3 (9), 19. <https://doi.org/10.3410/B3-19>.
- (200) Teodoro, M.; Kavradi, L. Conformational Flexibility Models for the Receptor in Structure Based Drug Design. *Curr. Pharm. Des.*, **2005**, 9 (20), 1635–1648. <https://doi.org/10.2174/1381612033454595>.

- (201) Bissantz, C.; Folkers, G.; Rognan, D. Protein-Based Virtual Screening of Chemical Databases. 1. Evaluation of Different Docking/Scoring Combinations. *J. Med. Chem.*, **2000**, 43 (25), 4759–4767. <https://doi.org/10.1021/JM001044L>.
- (202) Wallqvist, A.; Covell, D. Docking Enzyme-Inhibitor Complexes Using a Preference-Based Free-Energy Surface. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, **1996**, 25 (4), 403–419. <https://doi.org/10.1002/PROT.1>.
- (203) Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P. Empirical Scoring Functions: I. The Development of a Fast Empirical Scoring Function to Estimate the Binding Affinity of Ligands in Receptor Complexes. *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **1997**, 11 (5), 425–445. <https://doi.org/10.1023/A:1007996124545>.
- (204) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 117 (19), 5179–5197. <https://doi.org/10.1021/JA00124A002>.
- (205) Brooks, B. R.; Brooks, C. L.; Mackerell, A. D.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caffisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoscek, M.; Im, W.; Kuczera, K.; Lazaridis, T.; Ma, J.; Ovchinnikov, V.; Paci, E.; Pastor, R. W.; Post, C. B.; Pu, J. Z.; Schaefer, M.; Tidor, B.; Venable, R. M.; Woodcock, H. L.; Wu, X.; Yang, W.; York, D. M.; Karplus, M. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J. Comput. Chem.*, **2009**, 30 (10), 1545. <https://doi.org/10.1002/JCC.21287>.
- (206) Scott, W. R. P.; Hünenberger, P. H.; Tironi, I. G.; Mark, A. E.; Billeter, S. R.; Fennel, J.; Torda, A. E.; Huber, T.; Krüger, P.; Van Gunsteren, W. F. The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *J. Phys. Chem. A*, **1999**, 103 (19), 3596–3607. <https://doi.org/10.1021/JP984217F>.
- (207) Alder, B. J.; Wainwright, T. E. Phase Transition for a Hard Sphere System. *J. Chem. Phys.*, **2004**, 27 (5), 1208. <https://doi.org/10.1063/1.1743957>.
- (208) McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. Dynamics of Folded Proteins. *Nature*, **1977**, 267 (5612), 585–590. <https://doi.org/10.1038/267585a0>.
- (209) Stone, J. E.; Hardy, D. J.; Ufimtsev, I. S.; Schulten, K. GPU-Accelerated Molecular Modeling Coming Of Age. *J. Mol. Graph. Model.*, **2010**, 29 (2), 116. <https://doi.org/10.1016/J.JMGM.2010.06.010>.
- (210) GPU accelerated NAMD: NAMD benchmark datasets. <http://www.nvidia.com/object/gpu-accelerated-applications-namd-benchmarks.html>.

- (211) Verlet, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. II. Equilibrium Correlation Functions. *Phys. Rev.*, **1968**, 165 (1), 201. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.165.201>.
- (212) Hockney, R. W. The Potential Calculation and Some Applications. *Methods Comput. Phys.*, **1970**, 9, 135–211.
- (213) Swope, W. C.; Andersen, H. C.; Berens, P. H.; Wilson, K. R. A Computer Simulation Method for the Calculation of Equilibrium Constants for the Formation of Physical Clusters of Molecules: Application to Small Water Clusters. *J. Chem. Phys.*, **1998**, 76 (1), 637. <https://doi.org/10.1063/1.442716>.
- (214) Salomon-Ferrer, R.; Götz, A. W.; Poole, D.; Le Grand, S.; Walker, R. C. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. *J. Chem. Theory Comput.*, **2013**, 9 (9), 3878–3888. <https://doi.org/10.1021/ct400314y>.
- (215) Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. . Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J. Comput. Phys.*, **1977**, 23 (3), 327–341. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5).
- (216) Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*; Eddison Wesley Longman Limited: Essex, England, **1996**.
- (217) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.*, **1984**, 81 (8), 3684–3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>.
- (218) Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*; John Wiley & Sons, Ltd, **2006**.
- (219) Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.*, **1964**, 136 (3B), B864. <https://doi.org/10.1103/PHYSREV.136.B864/FIGURE/1/THUMB>.
- (220) Kohn, W.; Sham, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.*, **1965**, 140 (4A), A1133. <https://doi.org/10.1103/PHYSREV.140.A1133/FIGURE/1/THUMB>.
- (221) Warshel, A.; Karplus, M. Calculation of Ground and Excited State Potential Surfaces of Conjugated Molecules. I. Formulation and Parametrization. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 94 (16), 5612–5625. <https://doi.org/10.1021/JA00771A014>.
- (222) Warshel, A.; Levitt, M. Theoretical Studies of Enzymic Reactions: Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of the Carbonium Ion in the Reaction of Lysozyme. *J. Mol. Biol.*, **1976**, 103 (2), 227–249. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90311-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90311-9).

- (223) Field, M. J.; Bash, P. A.; Karplus, M. A Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Potential for Molecular Dynamics Simulations. *J. Comput. Chem.*, **1990**, 11 (6), 700–733. <https://doi.org/10.1002/JCC.540110605>.
- (224) Senn, H. M.; Thiel, W. QM/MM Studies of Enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2007**, 11 (2), 182–187. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2007.01.684>.
- (225) Karplus, M. Development of Multiscale Models for Complex Chemical Systems: From H₂ to Biomolecules (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2014**, 53 (38), 9992–10005. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201403924>.
- (226) Levitt, M. Birth and Future of Multiscale Modeling for Macromolecular Systems (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2014**, 53 (38), 10006–10018. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201403691>.
- (227) Warshel, A. Multiscale Modeling of Biological Functions: From Enzymes to Molecular Machines (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2014**, 53 (38), 10020–10031. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201403689>.
- (228) Bakowies, D.; Thiel, W. Hybrid Models for Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Approaches. *J. Phys. Chem.*, **1996**, 100 (25), 10580–10594. <https://doi.org/10.1021/jp9536514>.
- (229) Antes, I.; Thiel, W. Adjusted Connection Atoms for Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Methods. *J. Phys. Chem. A*, **1999**, 103 (46), 9290–9295. https://doi.org/10.1021/JP991771W/SUPPL_FILE/JP991771W_S.PDF.
- (230) Nam, K.; Gao, J.; York, D. M. An Efficient Linear-Scaling Ewald Method for Long-Range Electrostatic Interactions in Combined QM/MM Calculations. *J. Chem. Theory Comput.*, **2004**, 1 (1), 2–13. <https://doi.org/10.1021/CT049941I>.
- (231) Schaefer, P.; Riccardi, D.; Cui, Q. Reliable Treatment of Electrostatics in Combined QM/MM Simulation of Macromolecules. *J. Chem. Phys.*, **2005**, 123 (1), 014905. <https://doi.org/10.1063/1.1940047>.
- (232) Maseras, F.; Morokuma, K. IMOMM: A New Integrated Ab Initio + Molecular Mechanics Geometry Optimization Scheme of Equilibrium Structures and Transition States. *J. Comput. Chem.*, **1995**, 16 (9), 1170–1179. <https://doi.org/10.1002/JCC.540160911>.
- (233) Sherwood, P.; De Vries, A. H.; Collins, S. J.; Greatbanks, S. P.; Burton, N. A.; Vincent, M. A.; Hillier, I. H. Computer Simulation of Zeolite Structure and Reactivity Using Embedded Cluster Methods. *Faraday Discuss.*, **1997**, 106 (0), 79–92. <https://doi.org/10.1039/A701790A>.

- (234) Sherwood, P.; De Vries, A. H.; Guest, M. F.; Schreckenbach, G.; Catlow, C. R. A.; French, S. A.; Sokol, A. A.; Bromley, S. T.; Thiel, W.; Turner, A. J.; Billeter, S.; Terstegen, F.; Thiel, S.; Kendrick, J.; Rogers, S. C.; Casci, J.; Watson, M.; King, F.; Karlsen, E.; Sjøvoll, M.; Fahmi, A.; Schäfer, A.; Lennartz, C. QUASI: A General Purpose Implementation of the QM/MM Approach and Its Application to Problems in Catalysis. *J. Mol. Struct. Theochem*, **2003**, 632 (1–3), 1–28. [https://doi.org/10.1016/s0166-1280\(03\)00285-9](https://doi.org/10.1016/s0166-1280(03)00285-9).
- (235) Senn, H. M.; Thiel, W. QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2009**, 48 (7), 1198–1229. <https://doi.org/10.1002/anie.200802019>.
- (236) Murphy, R. B.; Philipp, D. M.; Friesner, R. A. Frozen Orbital QM/MM Methods for Density Functional Theory. *Chem. Phys. Lett.*, **2000**, 321 (1–2), 113–120. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(00\)00289-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(00)00289-X).
- (237) Philipp, D.; Friesner, R. Mixed Ab Initio QM/MM Modeling Using Frozen Orbitals and Tests with Alanine Dipeptide and Tetrapeptide. *J. Comput. Chem.*, **1999**, 20 (14), 1468–1494. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19991115\)20:14<1468::AID-JCC2>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19991115)20:14<1468::AID-JCC2>3.0.CO;2-0).
- (238) Garcia-Viloca, M.; Gao, J. Generalized Hybrid Orbital for the Treatment of Boundary Atoms in Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Calculations Using the Semiempirical Parameterized Model 3 Method. *Theor. Chem. Accounts*, **2003**, 111 (2), 280–286. <https://doi.org/10.1007/S00214-003-0512-9>.
- (239) Gao, J.; Amara, P.; Alhambra, C.; Field, M. J. A Generalized Hybrid Orbital (GHO) Method for the Treatment of Boundary Atoms in Combined QM/MM Calculations. *J. Phys. Chem. A*, **1998**, 102 (24), 4714–4721. <https://doi.org/10.1021/JP9809890>.
- (240) Zwanzig, R. W. High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *J. Chem. Phys.*, **2004**, 22 (8), 1420. <https://doi.org/10.1063/1.1740409>.
- (241) Torrie, G. M.; Valleau, J. P. Monte Carlo Free Energy Estimates Using Non-Boltzmann Sampling: Application to the Sub-Critical Lennard-Jones Fluid. *Chem. Phys. Lett.*, **1974**, 28 (4), 578–581. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(74\)80109-0](https://doi.org/10.1016/0009-2614(74)80109-0).
- (242) Torrie, G. M.; Valleau, J. P. Nonphysical Sampling Distributions in Monte Carlo Free-Energy Estimation: Umbrella Sampling. *J. Comput. Phys.*, **1977**, 23 (2), 187–199. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90121-8](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90121-8).

- (243) Kumar, S.; Rosenberg, J. M.; Bouzida, D.; Swendsen, R. H.; Kollman, P. A. THE Weighted Histogram Analysis Method for Free-energy Calculations on Biomolecules. I. The Method. *J. Comput. Chem.*, **1992**, 13 (8), 1011–1021. <https://doi.org/10.1002/jcc.540130812>.
- (244) Green, A. R.; Freedman, C.; Tena, J.; Tourdot, B. E.; Liu, B.; Holinstat, M.; Holman, T. R. 5S,15S-Dihydroperoxyeicosatetraenoic Acid (5,15-DiHpETE) as a Lipoxin Intermediate: Reactivity and Kinetics with Human Leukocyte 5-Lipoxygenase, Platelet 12-Lipoxygenase, and Reticulocyte 15-Lipoxygenase-1. *Biochemistry*, **2018**, 57 (48), 6726. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.8B00889>.
- (245) Kuhn, H.; Wiesner, R.; Alder, L.; Fitzsimmons, B. J.; Rokach, J.; Brash, A. R. Formation of Lipoxin B by the Pure Reticulocyte Lipoxygenase via Sequential Oxygenation of the Substrate. *Eur. J. Biochem.*, **1987**, 169 (3), 593–601. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb13650.x>.
- (246) Gordon, J. C.; Myers, J. B.; Folta, T.; Shoja, V.; Heath, L. S.; Onufriev, A. H++: A Server for Estimating PKas and Adding Missing Hydrogens to Macromolecules. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33 (Web Server), W368–W371. <https://doi.org/10.1093/nar/gki464>.
- (247) Anandakrishnan, R.; Aguilar, B.; Onufriev, A. V. H++ 3.0: Automating PK Prediction and the Preparation of Biomolecular Structures for Atomistic Molecular Modeling and Simulations. *Nucleic Acids Res.*, **2012**, 40 (W1), W537–W541. <https://doi.org/10.1093/nar/gks375>.
- (248) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.*, **1997**, 267 (3), 727–748. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0897>.
- (249) D.A. Case, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, D. Ghoreishi, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, D. Greene, R. Harris, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGra, D. M. Y. and P. A. K. AMBER 2018. University of California: San Francisco 2018.
- (250) Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. Ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from Ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.*, **2015**, 11 (8), 3696–3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>.
- (251) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.*, **2004**, 25 (9), 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>.

- (252) Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97 (40), 10269–10280. <https://doi.org/10.1021/j100142a004>.
- (253) Li, P.; Merz, K. M. MCPB.Py: A Python Based Metal Center Parameter Builder. *J. Chem. Inf. Model.*, **2016**, 56 (4), 599–604. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00674>.
- (254) Seminario, J. M. Calculation of Intramolecular Force Fields from Second-Derivative Tensors. *Int. J. Quantum Chem.*, **1996**, 60 (7), 1271–1277. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-461X\(1996\)60:7<1271::AID-QUA8>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-461X(1996)60:7<1271::AID-QUA8>3.0.CO;2-W).
- (255) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.*, **1983**, 79 (2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- (256) Le Grand, S.; Götz, A. W.; Walker, R. C. SPFP: Speed without Compromise—A Mixed Precision Model for GPU Accelerated Molecular Dynamics Simulations. *Comput. Phys. Commun.*, **2013**, 184 (2), 374–380. <https://doi.org/10.1016/J.CPC.2012.09.022>.
- (257) Metz, S.; Kästner, J.; Sokol, A. A.; Keal, T. W.; Sherwood, P. ChemShell—a Modular Software Package for QM/MM Simulations. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, **2014**, 4 (2), 101–110. <https://doi.org/10.1002/wcms.1163>.
- (258) Ahlrichs, R.; Bär, M.; Häser, M.; Horn, H.; Kölmel, C. Electronic Structure Calculations on Workstation Computers: The Program System Turbomole. *Chem. Phys. Lett.*, **1989**, 162 (3), 165–169. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(89\)85118-8](https://doi.org/10.1016/0009-2614(89)85118-8).
- (259) Smith, W.; Forester, T. R. DL-POLY-2.0: A General-Purpose Parallel Molecular Dynamics Simulation Package. *J. Mol. Graph.*, **1996**, 14 (3), 136–141. [https://doi.org/10.1016/S0263-7855\(96\)00043-4](https://doi.org/10.1016/S0263-7855(96)00043-4).
- (260) De Vries, A. H.; Sherwood, P.; Collins, S. J.; Rigby, A. M.; Rigutto, M.; Kramer, G. J. Zeolite Structure and Reactivity by Combined Quantum-Chemical-Classical Calculations. *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103 (29), 6133–6141. <https://doi.org/10.1021/jp9913012>.
- (261) Liu, D. C.; Nocedal, J. On the Limited Memory BFGS Method for Large Scale Optimization. *Math. Program.*, **1989**, 45 (1–3), 503–528. <https://doi.org/10.1007/BF01589116>.
- (262) Nocedal, J. Updating Quasi-Newton Matrices with Limited Storage. *Math. Comput.*, **1980**, 35 (151), 773–773. <https://doi.org/10.1090/s0025-5718-1980-0572855-7>.

- (263) Henkelman, G.; Jónsson, H. A Dimer Method for Finding Saddle Points on High Dimensional Potential Surfaces Using Only First Derivatives. *J. Chem. Phys.*, **1999**, 111 (15), 7010–7022. <https://doi.org/10.1063/1.480097>.
- (264) Heyden, A.; Bell, A. T.; Keil, F. J. Efficient Methods for Finding Transition States in Chemical Reactions: Comparison of Improved Dimer Method and Partitioned Rational Function Optimization Method. *J. Chem. Phys.*, **2005**, 123 (22), 224101. <https://doi.org/10.1063/1.2104507>.
- (265) Baker, J. An Algorithm for the Location of Transition States. *J. Comput. Chem.*, **1986**, 7 (4), 385–395. <https://doi.org/10.1002/jcc.540070402>.
- (266) Banerjee, A.; Adams, N.; Simons, J.; Shepard, R. Search for Stationary Points on Surfaces. *J. Phys. Chem.*, **1985**, 89 (1), 52–57. <https://doi.org/10.1021/j100247a015>.
- (267) Kästner, J.; Carr, J. M.; Keal, T. W.; Thiel, W.; Wander, A.; Sherwood, P. DL-FIND: An Open-Source Geometry Optimizer for Atomistic Simulations*. *J. Phys. Chem. A*, **2009**, 113 (43), 11856–11865. <https://doi.org/10.1021/jp9028968>.
- (268) Billeter, S. R.; Turner, A. J.; Thiel, W. Linear Scaling Geometry Optimisation and Transition State Search in Hybrid Delocalised Internal Coordinates. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2000**, 2 (10), 2177–2186. <https://doi.org/10.1039/a909486e>.
- (269) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98 (7), 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>.
- (270) Hay, P. J.; Wadt, W. R. Ab Initio Effective Core Potentials for Molecular Calculations. Potentials for the Transition Metal Atoms Sc to Hg. *J. Chem. Phys.*, **1985**, 82 (1), 270–283. <https://doi.org/10.1063/1.448799>.
- (271) Saura, P.; Suardíaz, R.; Masgrau, L.; Lluch, J. M.; González-Lafont, À. Unraveling How Enzymes Can Use Bulky Residues to Drive Site-Selective c-h Activation: The Case of Mammalian Lipoxygenases Catalyzing Arachidonic Acid Oxidation. *ACS Catal.*, **2014**, 4 (12), 4351–4363. <https://doi.org/10.1021/cs5006103>.
- (272) Soler, J.; Saura, P.; Garcíá-López, D.; Masgrau, L.; Lluch, J. M.; González-Lafont, À. How Can Linoleic Acid Be the Preferential Substrate of the Enzyme 15-Lipoxygenase-1? A QM/MM Approach. *J. Phys. Chem. B*, **2016**, 120 (8), 1950–1960. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b09897>.
- (273) Saura, P.; Kaganer, I.; Heydeck, D.; Lluch, J. M.; Kühn, H.; González-Lafont, À. Mutagenesis of Sequence Determinants of Truncated Porcine ALOX15 Induces Changes in the Reaction Specificity by Altering the Catalytic Mechanism of Initial Hydrogen Abstraction. *Chem. - A Eur. J.*, **2018**, 24 (4), 962–973. <https://doi.org/10.1002/chem.201704672>.

- (274) Adel, S.; Karst, F.; González-Lafont, À.; Pekárová, M.; Saura, P.; Masgrau, L.; Lluch, J. M.; Stehling, S.; Horn, T.; Kuhn, H.; Heydeck, D. Evolutionary Alteration of ALOX15 Specificity Optimizes the Biosynthesis of Antiinflammatory and Proresolving Lipoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2016**, 113 (30), E4266–E4275. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604029113>.
- (275) Chovancova, E.; Pavelka, A.; Benes, P.; Strnad, O.; Brezovsky, J.; Kozlikova, B.; Gora, A.; Sustr, V.; Klvana, M.; Medek, P.; Biedermannova, L.; Sochor, J.; Damborsky, J. CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures. *PLoS Comput. Biol.*, **2012**, 8 (10), e1002708. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002708>.
- (276) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.*, **1996**, 14 (1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- (277) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.*, **2004**, 25 (13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- (278) Jin, J.; Zheng, Y.; Boeglin, W. E.; Brash, A. R. Biosynthesis, Isolation, and NMR Analysis of Leukotriene A Epoxides: Substrate Chirality as a Determinant of the Cis or Trans Epoxide Configuration. *J. Lipid Res.*, **2013**, 54 (3), 754–761. <https://doi.org/10.1194/jlr.M033746>.
- (279) Chipot, C.; Pohorille, A.; *Free Energy Calculations. Theory and Applications in Chemistry and Biology*, Springer.; Springer Series in Chemical Physics: New York, **2007**.
- (280) Freedman, C.; Tran, A.; Tourdot, B. E.; Kalyanaraman, C.; Perry, S.; Holinstat, M.; Jacobson, M. P.; Holman, T. R. Biosynthesis of the Maresin Intermediate, 13S,14S-Epoxy-DHA, by Human 15-Lipoxygenase and 12-Lipoxygenase and Its Regulation through Negative Allosteric Modulators. *Biochemistry*, **2020**, 59 (19), 1832–1844. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00233>.
- (281) Wolfenden, R.; Snider, M. J. The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts. *Acc. Chem. Res.*, **2001**, 34 (12), 938–945. <https://doi.org/10.1021/ar000058i>.
- (282) Miller, B. G.; Wolfenden, R. Catalytic Proficiency: The Unusual Case of OMP Decarboxylase. *Annu. Rev. Biochem.*, **2002**, 71, 847–885. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135446>.
- (283) Richard, J. P. Enzymatic Rate Enhancements: A Review and Perspective. *Biochemistry*, **2013**, 52 (12), 2009–2011. <https://doi.org/10.1021/bi3017119>.

- (284) Warshel, A.; Bora, R. P. Perspective: Defining and Quantifying the Role of Dynamics in Enzyme Catalysis. *J. Chem. Phys.*, **2016**, 144 (18), 180901. <https://doi.org/10.1063/1.4947037>.
- (285) Ansari, A.; Berendzen, J.; Bowne, S. F.; Frauenfelder, H.; Iben, I. E.; Sauke, T. B.; Shyamsunder, E.; Young, R. D. Protein States and Proteinquakes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1985**, 82 (15), 5000–5004. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.15.5000>.
- (286) Ferrer, S.; Tuñón, I.; Martí, S.; Moliner, V.; Garcia-Viloca, M.; González-Lafont, À.; Lluch, J. M. A Theoretical Analysis of Rate Constants and Kinetic Isotope Effects Corresponding to Different Reactant Valleys in Lactate Dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128 (51), 16851–16863. <https://doi.org/10.1021/ja0653977>.
- (287) Min, W.; English, B. P.; Luo, G.; Cherayil, B. J.; Kou, S. C.; Xie, X. S. Fluctuating Enzymes: Lessons from Single-Molecule Studies. *Acc. Chem. Res.*, **2005**, 38 (12), 923–931. <https://doi.org/10.1021/ar040133f>.
- (288) Antikainen, N. M.; Smiley, R. D.; Benkovic, S. J.; Hammes, G. G. Conformation Coupled Enzyme Catalysis: Single-Molecule and Transient Kinetics Investigation of Dihydrofolate Reductase. *Biochemistry*, **2005**, 44 (51), 16835–16843. <https://doi.org/10.1021/bi051378i>.
- (289) Thorpe, I. F.; Brooks, C. L. Conformational Substates Modulate Hydride Transfer in Dihydrofolate Reductase. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127 (37), 12997–13006. <https://doi.org/10.1021/ja053558l>.
- (290) Xue, Q.; Yeung, E. S. Differences in the Chemical Reactivity of Individual Molecules of an Enzyme. *Nature*, **1995**, 373 (6516), 681–683. <https://doi.org/10.1038/373681a0>.
- (291) Tant, W.; Yeung, E. S. Monitoring the Reactions of Single Enzyme Molecules and Single Metal Ions. *Anal. Chem.*, **1997**, 69 (20), 4242–4248. <https://doi.org/10.1021/ac970631k>.
- (292) Kou, S. C.; Cherayil, B. J.; Min, W.; English, B. P.; Xie, X. S. Single-Molecule Michaelis - Menten Equations. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109 (41), 19068–19081. <https://doi.org/10.1021/jp051490q>.
- (293) Smiley, R. D.; Hammes, G. G. Single Molecule Studies of Enzyme Mechanisms. *Chem. Rev.*, **2006**, 106 (8), 3080–3094. <https://doi.org/10.1021/cr0502955>.
- (294) Lu, H. P.; Xun, L. Y. Single-Molecule Enzymatic Dynamics. *Science*, **1998**, 282 (5395), 1877–1882. <https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1877>.

- (295) Yang, H.; Luo, G.; Karnchanaphanurach, P.; Louie, T. M.; Rech, I.; Cova, S.; Xun, L.; Xie, X. S. Protein Conformational Dynamics Probed by Single-Molecule Electron Transfer. *Science*, **2003**, 302 (5643), 262–266. <https://doi.org/10.1126/science.1086911>.
- (296) Gupta, A.; Milias-Argentis, A.; Khammash, M. Dynamic Disorder in Simple Enzymatic Reactions Induces Stochastic Amplification of Substrate. *J. R. Soc. Interface*, **2017**, 14 (132), 20170311. <https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0311>.
- (297) Ribeiro, A. J. M.; Santos-Martins, D.; Russo, N.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. A. Enzymatic Flexibility and Reaction Rate: A QM/MM Study of HIV-1 Protease. *ACS Catal.*, **2015**, 5 (9), 5617–5626. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b00759>.
- (298) Hu, P.; Zhang, Y. Catalytic Mechanism and Product Specificity of the Histone Lysine Methyltransferase SET7/9: An Ab Initio QM/MM-FE Study with Multiple Initial Structures. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128 (4), 1272–1278. <https://doi.org/10.1021/JA056153+>.
- (299) Lodola, A.; Mor, M.; Zurek, J.; Tarzia, G.; Piomelli, D.; Harvey, J. N.; Mulholland, A. J. Conformational Effects in Enzyme Catalysis: Reaction via a High Energy Conformation in Fatty Acid Amide Hydrolase. *Biophys. J.*, **2007**, 92 (2), L20. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.098434>.
- (300) Roca, M.; Messer, B.; Hilvert, D.; Warshel, A. On the Relationship between Folding and Chemical Landscapes in Enzyme Catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, 105 (37), 13877–13882. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803405105>.
- (301) Benkovic, S. J.; Hammes, G. G.; Hammes-Schiffer, S. Free-Energy Landscape of Enzyme Catalysis. *Biochemistry*, **2008**, 47 (11), 3317–3321. <https://doi.org/10.1021/bi800049z>.
- (302) Lodola, A.; Sirirak, J.; Fey, N.; Rivara, S.; Mor, M.; Mulholland, A. J. Structural Fluctuations in Enzyme-Catalyzed Reactions: Determinants of Reactivity in Fatty Acid Amide Hydrolase from Multivariate Statistical Analysis of Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Paths. *J. Chem. Theory Comput.*, **2010**, 6 (9), 2948–2960. <https://doi.org/10.1021/ct100264j>.
- (303) Lonsdale, R.; Harvey, J. N.; Mulholland, A. J. Compound I Reactivity Defines Alkene Oxidation Selectivity in Cytochrome P450cam. *J. Phys. Chem. B*, **2010**, 114 (2), 1156–1162. <https://doi.org/10.1021/jp910127j>.
- (304) Ribeiro, A. J. M.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. A. The Catalytic Mechanism of HIV-1 Integrase for DNA 3'-End Processing Established by QM/MM Calculations. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134 (32), 13436–13447. <https://doi.org/10.1021/ja304601k>.

- (305) Sanchez-Martinez, M.; Marcos, E.; Tauler, R.; Field, M.; Crehuet, R. Conformational Compression and Barrier Height Heterogeneity in the N-Acetylglutamate Kinase. *J. Phys. Chem. B*, **2013**, 117 (46), 14261–14272. <https://doi.org/10.1021/jp407016v>.
- (306) Lonsdale, R.; Houghton, K. T.; Zurek, J.; Bathelt, C. M.; Foloppe, N.; De Groot, M. J.; Harvey, J. N.; Mulholland, A. J. Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Modeling of Regioselectivity of Drug Metabolism in Cytochrome P450 2C9. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135 (21), 8001–8015. <https://doi.org/10.1021/ja402016p>.
- (307) Von Der Esch, B.; Dietschreit, J. C. B.; Peters, L. D. M.; Ochsenfeld, C. Finding Reactive Configurations: A Machine Learning Approach for Estimating Energy Barriers Applied to Sirtuin 5. *J. Chem. Theory Comput.*, **2019**, 15 (12), 6660–6667. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00876>.
- (308) Zhang, Y.; Kua, J.; McCammon, J. A. Influence of Structural Fluctuation on Enzyme Reaction Energy Barriers in Combined Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Studies. *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107 (18), 4459–4463. <https://doi.org/10.1021/jp022525e>.
- (309) Cooper, A. M.; Kästner, J. Averaging Techniques for Reaction Barriers in QM/MM Simulations. *ChemPhysChem*, **2014**, 15 (15), 3264–3269. <https://doi.org/10.1002/cphc.201402382>.
- (310) Logunov, I.; Schulten, K. Quantum Chemistry: Molecular Dynamics Study of the Dark-Adaptation Process in Bacteriorhodopsin. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118 (40), 9727–9735. <https://doi.org/10.1021/ja953091m>.
- (311) Lonsdale, R.; Hoyle, S.; Grey, D. T.; Ridder, L.; Mulholland, A. J. Determinants of Reactivity and Selectivity in Soluble Epoxide Hydrolase from Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Modeling. *Biochemistry*, **2012**, 51 (8), 1774–1786. <https://doi.org/10.1021/bi201722j>.
- (312) Masgrau, L.; González-Lafont, À.; Lluch, J. M.; Computational Enzymology Modelling Biological Catalysts. In *Computational Tools for Chemical Biology*; Marín-Santamaría, S., Ed.; Cambridge, UK, **2018**; pp 108–144.
- (313) Schenter, G. K.; Garrett, B. C.; Truhlar, D. G. Generalized Transition State Theory in Terms of the Potential of Mean Force. *J. Chem. Phys.*, **2003**, 119 (12), 5828–5833. <https://doi.org/10.1063/1.1597477>.
- (314) Romero-Téllez, S.; Lluch, J. M.; González-Lafont, À.; Masgrau, L. Comparing Hydrolysis and Transglycosylation Reactions Catalyzed by Thermus Thermophilus β -Glycosidase. A Combined MD and QM/MM Study. *Front. Chem.*, **2019**, 7, 200. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00200>.
- (315) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

- (316) Kirschner, K. N.; Yongye, A. B.; Tschampel, S. M.; González-Outeiriño, J.; Daniels, C. R.; Foley, B. L.; Woods, R. J. GLYCAM06: A Generalizable Biomolecular Force Field. *Carbohydrates. J. Comput. Chem.*, **2008**, 29 (4), 622–655. <https://doi.org/10.1002/jcc.20820>.
- (317) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J. Chem. Phys.*, **1995**, 103 (19), 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>.
- (318) Götz, A. W.; Williamson, M. J.; Xu, D.; Poole, D.; Le Grand, S.; Walker, R. C. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized Born. *J. Chem. Theory Comput.*, **2012**, 8 (5), 1542–1555. <https://doi.org/10.1021/ct200909j>.
- (319) Elstner, M.; Porezag, D.; Jungnickel, G.; Elsner, J.; Haugk, M.; Frauenheim, T. Self-Consistent-Charge Density-Functional Tight-Binding Method for Simulations of Complex Materials Properties. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, **1998**, 58 (11), 7260–7268. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.58.7260>.
- (320) Catalano, A.; Procopio, A. New Aspects on the Role of Lipoxygenases in Cancer Progression. *Histol. Histopathol.*, **2005**, 20 (3), 969–975. <https://doi.org/10.14670/HH-20.969>.
- (321) Dobrian, A. D.; Lieb, D. C.; Cole, B. K.; Taylor-Fishwick, D. A.; Chakrabarti, S. K.; Nadler, J. L. Functional and Pathological Roles of the 12- and 15-Lipoxygenases. *Prog. Lipid. Res.*, **2011**, 50(1), 115–131. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.10.005>.
- (322) Joo, Y. C.; Oh, D. K. Lipoxygenases: Potential Starting Biocatalysts for the Synthesis of Signaling Compounds. *Biotechnol. Adv.*, **2012**, 30 (6), 1524–1532. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2012.04.004>.
- (323) Newcomer, M. E.; Brash, A. R. The Structural Basis for Specificity in Lipoxygenase Catalysis. *Protein Sci.*, **2015**, 24 (3), 298–309. <https://doi.org/10.1002/pro.2626>.
- (324) Borngräber, S.; Browner, M.; Gillmor, S.; Gerth, C.; Anton, M.; Fletterick, R.; Kühn, H. Shape and Specificity in Mammalian 15-Lipoxygenase Active Site. The Functional Interplay of Sequence Determinants for the Reaction Specificity. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274 (52), 37345–37350. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.52.37345>.
- (325) Tosco, P. A Mechanistic Hypothesis for the Aspirin-Induced Switch in Lipid Mediator Production by Cyclooxygenase-2. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135 (28), 10404–10410. <https://doi.org/10.1021/ja402870k>.

- (326) Hariharan, P. C.; Pople, J. A. The Influence of Polarization Functions on Molecular Orbital Hydrogenation Energies. *Theor. Chim. Acta*, **1973**, 28 (3), 213–222. <https://doi.org/10.1007/BF00533485>.
- (327) Suardíaz, R.; Jambrina, P. G.; Masgrau, L.; González-Lafont, À.; Rosta, E.; Lluch, J. M. Understanding the Mechanism of the Hydrogen Abstraction from Arachidonic Acid Catalyzed by the Human Enzyme 15-Lipoxygenase-2. A Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Free Energy Simulation. *J. Chem. Theory Comput.*, **2016**, 12 (4), 2079–2090. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b01236>.
- (328) Ivanov, I.; Di Venere, A.; Horn, T.; Scheerer, P.; Nicolai, E.; Stehling, S.; Richter, C.; Skrzypczak-Jankun, E.; Mei, G.; MacCarrone, M.; Kühn, H. Tight Association of N-Terminal and Catalytic Subunits of Rabbit 12/15-Lipoxygenase Is Important for Protein Stability and Catalytic Activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1811 (12), 1001–1010. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2011.08.008>.
- (329) Aleem, A. M.; Tsai, W. C.; Tena, J.; Alvarez, G.; Deschamps, J.; Kalyanaraman, C.; Jacobson, M. P.; Holman, T. Probing the Electrostatic and Steric Requirements for Substrate Binding in Human Platelet-Type 12-Lipoxygenase. *Biochemistry*, **2019**, 58 (6), 848–857. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.8B01167>.
- (330) Meng, H.; Dai, Z.; Zhang, W.; Liu, Y.; Lai, L. Molecular Mechanism of 15-Lipoxygenase Allosteric Activation and Inhibition. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, 20 (21), 14785–14795. <https://doi.org/10.1039/C7CP08586A>.
- (331) Freire-Moar, J.; Alavi-Nassab, A.; Ng, M.; Mulkins, M.; Sigal, E. Cloning and Characterization of a Murine Macrophage Lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, 1254 (1), 112–116. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)00199-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)00199-9).
- (332) Watanabe, T.; Medina, J. F.; Haeggström, J. Z.; Rådmark, O.; Samuelsson, B. Molecular Cloning of a 12-Lipoxygenase cDNA from Rat Brain. *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 212 (2), 605–612. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1993.TB17699.X>.
- (333) Pekárová, M.; Kuhn, H.; Bezáková, L.; Ufer, C.; Heydeck, D. Mutagenesis of Triad Determinants of Rat Alox15 Alters the Specificity of Fatty Acid and Phospholipid Oxygenation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2015**, 571, 50–57. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2015.02.029>.
- (334) De Marzo, N.; Sloane, D. L.; Dicharry, S.; Highland, E.; Sigal, E. Cloning and Expression of an Airway Epithelial 12-Lipoxygenase. *Am. J. Physiol.*, **1992**, 262 (2 Pt 1), L198–207. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.1992.262.2.L198>.

- (335) Yokoyama, C.; Shinjo, F.; Yoshimoto, T.; Yamamoto, S.; Oates, J. A.; Brash, A. R. Arachidonate 12-Lipoxygenase Purified from Porcine Leukocytes by Immunoaffinity Chromatography and Its Reactivity with Hydroperoxyeicosatetraenoic Acids. *J. Biol. Chem.*, **1986**, *261* (35), 16714–16721. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)66623-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)66623-2).
- (336) Kozlov, N.; Humeniuk, L.; Ufer, C.; Ivanov, I.; Golovanov, A.; Stehling, S.; Heydeck, D.; Kuhn, H. Functional Characterization of Novel ALOX15 Orthologs Representing Key Steps in Mammalian Evolution Supports the Evolutionary Hypothesis of Reaction Specificity. *Biochim. Biophys. acta. Mol. cell Biol. lipids*, **2019**, *1864* (3), 372–385. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2018.12.016>.
- (337) Wecksler, A. T.; Kenyon, V.; Deschamps, J. D.; Holman, T. R. Substrate Specificity Changes for Human Reticulocyte and Epithelial 15-Lipoxygenases Reveal Allosteric Product Regulation. *Biochemistry*, **2008**, *47* (28), 7364–7375. https://doi.org/10.1021/BI800550N/ASSET/IMAGES/BI800550N.SOCIAL.JPG_V03.
- (338) Wecksler, A. T.; Jacquot, C.; Van Der Donk, W. A.; Holman, T. R. Mechanistic Investigations of Human Reticulocyte 15- and Platelet 12-Lipoxygenases with Arachidonic Acid. *Biochemistry*, **2009**, *48* (26), 6259. <https://doi.org/10.1021/BI802332J>.
- (339) Kobe, M. J.; Neau, D. B.; Mitchell, C. E.; Bartlett, S. G.; Newcomer, M. E. The Structure of Human 15-Lipoxygenase-2 with a Substrate Mimic. *J. Biol. Chem.*, **2014**, *289* (12), 8562–8569. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.543777>.
- (340) Xu, S.; Mueser, T. C.; Marnett, L. J.; Funk, M. O. Crystal Structure of 12-Lipoxygenase Catalytic-Domain-Inhibitor Complex Identifies a Substrate-Binding Channel for Catalysis. *Structure*, **2012**, *20* (9), 1490–1497. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2012.06.003>.
- (341) Droege, K. D.; Keithly, M. E.; Sanders, C. R.; Armstrong, R. N.; Thompson, M. K. Structural Dynamics of 15-Lipoxygenase-2 via Hydrogen-Deuterium Exchange. *Biochemistry*, **2017**, *56* (38), 5065–5074. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.7B00559>.
- (342) Ackermann, J. A.; Hofheinz, K.; Zaiss, M. M.; Krönke, G. The Double-Edged Role of 12/15-Lipoxygenase during Inflammation and Immunity. *Biochim. Biophys. acta. Mol. cell Biol. lipids*, **2017**, *1862* (4), 371–381. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2016.07.014>.
- (343) Zheng, Y.; Liu, Y.; Karatas, H.; Yigitkanli, K.; Holman, T. R.; van Leyen, K. Contributions of 12/15-Lipoxygenase to Bleeding in the Brain Following Ischemic Stroke. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2019**, *1161*, 125–131. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21735-8_12.

- (344) Serhan, C. N.; Jain, A.; Marleau, S.; Clish, C.; Kantarci, A.; Behbehani, B.; Colgan, S. P.; Stahl, G. L.; Merched, A.; Petasis, N. A.; Chan, L.; Van Dyke, T. E. Reduced Inflammation and Tissue Damage in Transgenic Rabbits Overexpressing 15-Lipoxygenase and Endogenous Anti-Inflammatory Lipid Mediators. *J. Immunol.*, **2003**, 171 (12), 6856–6865. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.171.12.6856>.
- (345) Lee, S. I. L.; Zuo, X.; Shureiqi, I. 15-Lipoxygenase-1 as a Tumor Suppressor Gene in Colon Cancer: Is the Verdict In? *Cancer Metastasis Rev.*, **2011**, 30 (3–4), 481–491. <https://doi.org/10.1007/S10555-011-9321-0>.
- (346) Rai, G.; Joshi, N.; Jung, J. E.; Liu, Y.; Schultz, L.; Yasgar, A.; Perry, S.; Diaz, G.; Zhang, Q.; Kenyon, V.; Jadhav, A.; Simeonov, A.; Lo, E. H.; Van Leyen, K.; Maloney, D. J.; Holman, T. R. Potent and Selective Inhibitors of Human Reticulocyte 12/15-Lipoxygenase as Anti-Stroke Therapies. *J. Med. Chem.*, **2014**, 57 (10), 4035–4048. https://doi.org/10.1021/JM401915R/SUPPL_FILE/JM401915R_SI_001.PDF.
- (347) Ngu, K.; Weinstein, D. S.; Liu, W.; Langevine, C.; Combs, D. W.; Zhuang, S.; Chen, X.; Madsen, C. S.; Harper, T. W.; Ahmad, S.; Robl, J. A. Pyrazole-Based Sulfonamide and Sulfamides as Potent Inhibitors of Mammalian 15-Lipoxygenase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, 21 (14), 4141–4145. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2011.05.107>.
- (348) Weinstein, D. S.; Liu, W.; Ngu, K.; Langevine, C.; Combs, D. W.; Zhuang, S.; Chen, C.; Madsen, C. S.; Harper, T. W.; Robl, J. A. Discovery of Selective Imidazole-Based Inhibitors of Mammalian 15-Lipoxygenase: Highly Potent against Human Enzyme within a Cellular Environment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17 (18), 5115–5120. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2007.07.011>.
- (349) Sendobry, S. M.; Cornicelli, J. A.; Welch, K.; Bocan, T.; Tait, B.; Trivedi, B. K.; Colbry, N.; Dyer, R. D.; Feinmark, S. J.; Daugherty, A. Attenuation of Diet-Induced Atherosclerosis in Rabbits with a Highly Selective 15-Lipoxygenase Inhibitor Lacking Significant Antioxidant Properties. *Br. J. Pharmacol.*, **1997**, 120 (7), 1199–1206. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0701007>.
- (350) Barvian, N. C.; O'brian, P. M.; Patt, W. C.; Picard, J. A.; Sliskovic, D. R. 1,2,4-Trisubstituted Benzenes as Inhibitors of 15-Lipoxygenase. WO096298 A22001.
- (351) Connor, D.; Roark, W.; Sorenson, R. Indole and Benzimidazole 15-Lipoxygenase Inhibitors. US0,038,943A12004.
- (352) Eleftheriadis, N.; Neochoritis, C. G.; Leus, N. G. J.; Van Der Wouden, P. E.; Dömling, A.; Dekker, F. J. Rational Development of a Potent 15-Lipoxygenase-1 Inhibitor with in Vitro and Ex Vivo Anti-Inflammatory Properties. *J. Med. Chem.*, **2015**, 58 (19), 7850–7862. <https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.5B01121>.

- (353) Weinstein, D. S.; Liu, W.; Gu, Z.; Langevine, C.; Ngu, K.; Fadnis, L.; Combs, D. W.; Sitkoff, D.; Ahmad, S.; Zhuang, S.; Chen, X.; Wang, F. L.; Loughney, D. A.; Atwal, K. S.; Zahler, R.; Macor, J. E.; Madsen, C. S.; Murugesan, N. Tryptamine and Homotryptamine-Based Sulfonamides as Potent and Selective Inhibitors of 15-Lipoxygenase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15 (5), 1435–1440. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2004.12.081>.
- (354) Ludwig, P.; Holzhütter, H. -G; Colosimo, A.; Silvestrini, M. C.; Schewe, T.; Rapoport, S. M. A Kinetic Model for Lipoxygenases Based on Experimental Data with the Lipoxygenase of Reticulocytes. *Eur. J. Biochem.*, **1987**, 168 (2), 325–337. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1987.TB13424.X>.
- (355) Ivanov, I.; Golovanov, A. B.; Ferretti, C.; Canyelles-Niño, M.; Heydeck, D.; Stehling, S.; Lluch, J. M.; González-Lafont, À.; Kühn, H. Mutations of Triad Determinants Changes the Substrate Alignment at the Catalytic Center of Human ALOX5. *ACS Chem. Biol.*, **2019**, 14 (12), 2768–2782. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00674>.
- (356) Di Venere, A.; Horn, T.; Stehling, S.; Mei, G.; Masgrau, L.; González-Lafont, À.; Kühn, H.; Ivanov, I. Role of Arg403 for Thermostability and Catalytic Activity of Rabbit 12/15-Lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **2013**, 1831 (6), 1079–1088. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2013.02.006>.
- (357) Saura, P.; Suardíaz, R.; Masgrau, L.; González-Lafont, À.; Rosta, E.; Lluch, J. M. Understanding the Molecular Mechanism of the Ala-versus-Gly Concept Controlling the Product Specificity in Reactions Catalyzed by Lipoxygenases: A Combined Molecular Dynamics and QM/MM Study of Coral 8R-Lipoxygenase. *ACS Catal.*, **2017**, 7 (7), 4854–4866. https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.7B00842/SUPPL_FILE/CS7B00842_SI_001.PDF.
- (358) Ivanov, I.; Saam, J.; Kuhn, H.; Holzhütter, H. G. Dual Role of Oxygen during Lipoxygenase Reactions. *FEBS J.*, **2005**, 272 (10), 2523–2535. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2005.04673.X>.
- (359) Kuhn, H.; Sprecher, H.; Brash, A. R. On Singular or Dual Positional Specificity of Lipoxygenases. The Number of Chiral Products Varies with Alignment of Methylene Groups at the Active Site of the Enzyme. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265 (27), 16300–16305. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)46222-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)46222-3).
- (360) Sigal, E.; Craik, C. S.; Highland, E.; Grunberger, D.; Costello, L. L.; Dixon, R. A. F.; Nadel, J. A. Molecular Cloning and Primary Structure of Human 15-Lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, 157 (2), 457–464. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80271-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80271-7).
- (361) Kühn, H.; Heydeck, D.; Sprecher, H. On the Mechanistic Reasons for the Dual Positional Specificity of the Reticulocyte Lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, 1081 (2), 129–134. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90017-C](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90017-C).

- (362) Micsonai, A.; Wien, F.; Kernya, L.; Lee, Y. H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2015**, 112 (24), E3095–E3103.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1500851112/SUPPL_FILE/PNAS.201500851SI.PDF.
- (363) Micsonai, A.; Wien, F.; Bulyáki, É.; Kun, J.; Moussong, É.; Lee, Y. H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. BeStSel: A Web Server for Accurate Protein Secondary Structure Prediction and Fold Recognition from the Circular Dichroism Spectra. *Nucleic Acids Res.*, **2018**, 46 (W1), W315–W322.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKY497>.
- (364) Guvench, O.; MacKerell, A. D. Automated Conformational Energy Fitting for Force-Field Development. *J. Mol. Model.*, **2008**, 14 (8), 667–679.
<https://doi.org/10.1007/S00894-008-0305-0>.
- (365) Xu, Y.; Wang, S.; Hu, Q.; Gao, S.; Ma, X.; Zhang, W.; Shen, Y.; Chen, F.; Lai, L.; Pei, J. CavityPlus: A Web Server for Protein Cavity Detection with Pharmacophore Modelling, Allosteric Site Identification and Covalent Ligand Binding Ability Prediction. *Nucleic Acids Res.*, **2018**, 46 (W1), W374–W379.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky380>.
- (366) Aksenov, A. V.; Smirnov, A. N.; Aksenov, N. A.; Bijieva, A. S.; Aksenova, I. V.; Rubin, M. Benzimidazoles and Benzoxazoles via the Nucleophilic Addition of Anilines to Nitroalkanes. *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13 (14), 4289–4295.
<https://doi.org/10.1039/C5OB00131E>.
- (367) McGovern, S. L.; Caselli, E.; Grigorieff, N.; Shoichet, B. K. A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening. *J. Med. Chem.*, **2002**, 45 (8), 1712–1722.
https://doi.org/10.1021/JM010533Y/SUPPL_FILE/JM010533Y_S1.SDF.
- (368) Burrall, B. A.; Cheung, M.; Chiu, A.; Goetzl, E. J. Enzymatic Properties of the 15-Lipoxygenase of Human Cultured Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **1988**, 91 (4), 294–297. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP12475450>.
- (369) Lucido, M. J.; Orlando, B. J.; Vecchio, A. J.; Malkowski, M. G. Crystal Structure of Aspirin-Acetylated Human Cyclooxygenase-2: Insight into the Formation of Products with Reversed Stereochemistry. *Biochemistry*, **2016**, 55 (8), 1226–1238.
<https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.5B01378>.
- (370) Shahrokh, K.; Orendt, A.; Yost, G. S.; Cheatham, T. E. Quantum Mechanically Derived AMBER-Compatible Heme Parameters for Various States of the Cytochrome P450 Catalytic Cycle. *J. Comput. Chem.*, **2012**, 33 (2), 119–133.
<https://doi.org/10.1002/JCC.21922>.

- (371) Duchstein, P.; Neiss, C.; Görling, A.; Zahn, D. Molecular Mechanics Modeling of Azobenzene-Based Photoswitches. *J. Mol. Model.*, **2011**, 18 (6), 2479–2482. <https://doi.org/10.1007/S00894-011-1270-6>.
- (372) Wang, J. L.; Limburg, D.; Graneto, M. J.; Springer, J.; Hamper, J. R. B.; Liao, S.; Pawlitz, J. L.; Kurumbail, R. G.; Maziasz, T.; Talley, J. J.; Kiefer, J. R.; Carter, J. The Novel Benzopyran Class of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors. Part 2: The Second Clinical Candidate Having a Shorter and Favorable Human Half-Life. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20 (23), 7159–7163. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2010.07.054>.
- (373) Rådmark, O.; Samuelsson, B. Regulation of the Activity of 5-Lipoxygenase, a Key Enzyme in Leukotriene Biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2010**, 396 (1), 105–110. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.02.173>.
- (374) Serhan, C. N.; Chiang, N.; Van Dyke, T. E. Resolving Inflammation: Dual Anti-Inflammatory and pro-Resolution Lipid Mediators. *Nat. Rev. Immunol.*, **2008**, 8 (5), 349–361. <https://doi.org/10.1038/NRI2294>.
- (375) Adel, S.; Heydeck, D.; Kuhn, H.; Ufer, C. The Lipoxygenase Pathway in Zebrafish. Expression and Characterization of Zebrafish ALOX5 and Comparison with Its Human Ortholog. *Biochim. Biophys. Acta*, **2016**, 1861 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2015.10.001>.
- (376) Toledo, L.; Masgrau, L.; Maréchal, J. D.; Lluch, J. M.; González-Lafont, Á. Insights into the Mechanism of Binding of Arachidonic Acid to Mammalian 15-Lipoxygenases. *J. Phys. Chem. B*, **2010**, 114 (20), 7037–7046. <https://doi.org/10.1021/JP912120N>.
- (377) Golovanov, A.; Zhuravlev, A.; Cruz, A.; Aksenov, V.; Shafiullina, R.; Kakularam, K. R.; Lluch, J. M.; Kuhn, H.; González-Lafont, Á.; Ivanov, I. N-Substituted 5-(1 H-Indol-2-Yl)-2-Methoxyanilines Are Allosteric Inhibitors of the Linoleate Oxygenase Activity of Selected Mammalian ALOX15 Orthologs: Mechanism of Action. *J. Med. Chem.*, **2022**, 65 (3), 1979–1995. <https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.1C01563>.
- (378) Maas, R. L.; Ingram, C. D.; Taber, D. F. Stereospecific Removal of the DR Hydrogen Atom at the 10-Carbon of Arachidonic Acid in the Biosynthesis of Leukotriene A4 by Human Leukocytes. *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257 (22), 13515–13519. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)33477-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)33477-X).
- (379) Rådmark, O.; Samuelsson, B. Regulation of 5-Lipoxygenase Enzyme Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, 338 (1), 102–110. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.08.013>.
- (380) Glickman, M. H.; Klinman, J. P. Nature of Rate-Limiting Steps in the Soybean Lipoxygenase-1 Reaction. *Biochemistry*, **1995**, 34 (43), 14077–14092. <https://doi.org/10.1021/BI00043A013>.

- (381) Hamberg, M.; Hamberg, G. On the Mechanism of the Oxygenation of Arachidonic Acid by Human Platelet Lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1980**, 95 (3), 1090–1097. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(80\)91584-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)91584-3).
- (382) Romero-Télez, S.; Cruz, A.; Masgrau, L.; González-Lafont, À.; Lluch, J. M. Accounting for the Instantaneous Disorder in the Enzyme–Substrate Michaelis Complex to Calculate the Gibbs Free Energy Barrier of an Enzyme Reaction. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2021**, 23 (23), 13042–13054. <https://doi.org/10.1039/D1CP01338F>.
- (383) Mittal, M.; Kumar, R. B.; Balagunaseelan, N.; Hamberg, M.; Jegerschöld, C.; Rådmark, O.; Haeggström, J. Z.; Rinaldo-Matthis, A. Kinetic Investigation of Human 5-Lipoxygenase with Arachidonic Acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, 26 (15), 3547–3551. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2016.06.025>.
- (384) Perry, S. C.; Horn, T.; Tourdot, B. E.; Yamaguchi, A.; Kalyanaraman, C.; Conrad, W. S.; Akinkugbe, O.; Holinstat, M.; Jacobson, M. P.; Holman, T. R. Role of Human 15-Lipoxygenase-2 in the Biosynthesis of the Lipoxin Intermediate, 5S,15S-DihpETE, Implicated with the Altered Positional Specificity of Human 15-Lipoxygenase-1. *Biochemistry*, **2020**, 59 (42), 4118–4130. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.0C00622/SUPPL_FILE/BI0C00622_SI_001.PDF.