

Títol del treball:

## **Estudi computacional de la selectivitat d'un enzim hidrolasa d'epòxids**

---

Estudiant: Guillem Casadevall Frano

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: u1928701@campus.udg.edu

Tutor: Pedro Salvador Sedano

Cotutor\*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor\*):

Nom del tutor: Pedro Salvador Sedano

Nom del cotutor\*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): pedro.salvador@udg.edu

\*si hi ha un cotutor assigna

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 26/05/2017

## Resum

Les necessitats socials i mediambientals actuals han promogut l'interès d'estudiar i comprendre com els enzims, els quals són els catalitzadors més eficients de la natura, duen a terme la seva funció. Tot i que la majoria d'enzims extrets directament de la natura no són suficientment eficients per a dur a terme les reaccions en les indústries químiques, la seva aplicació en la indústria farmacèutica o la química fina.

Els enzims són macromolècules innòcues, biodegradables, eficients i selectius que podrien constituir una alternativa atractiva des del punt de vista mediambiental. En aquest treball en concret, s'estudia l'enzim hidrolasa d'epòxids (EHs), el qual és capaç de hidrolitzar selectivament mescla racèmiques d'epòxids. Dur a terme l'obertura de l'anell de l'epòxid per generar el corresponen diol mitjançant mètodes convencionals partint de mescles racèmiques és molt difícil. En moltes síntesis de productes farmacèutics, com ara els beta bloquejants alprenolol o propranolol, s'utilitza un epòxid com a precursors. Per aquest motiu, l'ús d'EHs a la indústria resultat tan prometedor, ja que es podrien obtenir els compostos amb una alt grau de puresa.

De totes les EHs, l'enzim que s'estudia és l'hidrolasa d'epòxids que prové del *Bacillus megaterium*, ja que recents estudis indiquen com aquesta EH en particular presentar una gran enantioselectivitat i regioselectivitat envers epòxids aromàtics voluminosos, a banda d'altres propietats. Per contra, també es sap que aquesta classe d'enzims pateix d'inhibició per producte. Per aquest motiu, l'objectiu d'aquest treball és entendre els canvis estructurals que afecten l'eficiència de l'enzim a través de simulacions de dinàmiques moleculars de l'enzim en *apo*, amb presència de substrat (amb només un dels dos enantiòmers o com a mescla racèmica) i amb productes. A les simulacions, s'ha observat que tots els substrats entren al centre actiu i es posicionen correctament per a que es doni la reacció. En canvi els productes arriben en molta menys freqüència, però un cop interaccionen amb al centre actiu inhibeixen l'enzim. Finalment, s'observa l'obertura d'un túnel a l'interior de l'enzim que permetria explicar que l'entrada del substrat i la sortida del producte es produeix per a llocs diferents.

## Resumen

Las necesidades sociales y medioambientales actuales han impulsado el interés de estudiar y comprender como las enzimas, que son los catalizadores más eficientes en la natura, realizan su función. Aun así, la mayoría de las enzimas que se encuentran en la natura no son suficientemente eficientes para llevar a cabo las reacciones que tienen lugar en las industrias químicas, como por ejemplo las farmacéuticas o las de química fina.

Las enzimas son macromoléculas inocuas, biodegradables, eficientes y selectivas que podrían representar una alternativa atractiva des del punto de vista medioambiental. En este trabajo concretamente se investiga la enzima hidrolasa de epóxidos, la cual es capaz de hidrolizar selectivamente mezcla racémicas de estos compuestos. Abrir selectivamente el anillo del epóxido utilizando métodos convencionales es muy difícil. En muchas síntesis de productos farmacéuticos, como por ejemplo los  $\beta$ -bloqueadores alprenolol o propranolol, epóxidos enantioméricamente puros se identifican como precursores. Por este motivo, el uso de EHs en la industria podría resultar tan prometedor, ya que podrían obtenerse estos compuestos quirales altamente puros.

De todas las EHs, la enzima que se investiga en este trabajo es aquella que se encuentra en el organismo *Bacillus megaterium* (BMEH). Esta EH en particular se caracteriza por una enantioselectividad moderada hacia epóxidos voluminosos. Aun así, se conoce que la mayoría de EH sufren inhibición por producto. Por este motivo, el objetivo de este trabajo consiste en entender los cambios estructurales que pueden afectar a la eficiencia de la enzima a través de simulaciones de dinámica molecular (MD) de la enzima en estado *apo*, en presencia del sustrato (con un único enantiómero o como mezcla racémica) i con productos.

En las simulaciones se ha observado que todos los sustratos entran hasta el centro activo y que se posicionan correctamente para llevar a cabo la reacción. En cambio, los productos llegan con mucha menos frecuencia, aunque una vez interaccionan con el centro activo provocan la inhibición de la enzima.

Finalmente, se observa la obertura de un túnel en el interior de la enzima que podría explicar que la entrada del sustrato y la salida del producto tienen lugar por rutas distintas.

## Resum

Enzymes are the most efficient catalysts found in nature. However, natural enzymes are not sufficiently efficient to perform chemical reactions that are important for the pharmaceutical and fine chemistry industries. Therefore, there is a need to understand how they are able to perform its function in order to improve their performance.

Enzymes are biodegradable, efficient, selective, and sustainable biomolecules that can become an alternative to other kinds of catalysts from the environmental point of view. In this project, the epoxide hydrolase (EH) enzyme that is able to selectively hydrolyze racemic mixtures of epoxides will be studied in detail. Using conventional methods it is difficult to observe the ring opening of the epoxide starting from racemic mixtures. A number of pharmaceutical compounds, such as alprenolol and propranolol beta-blockers, require the use of epoxide as precursors. The use of EHs in industry is promising because they allow obtaining the final product with high purity.

Here, the EH from *Bacillus megaterium* is studied because this particular EH shows a moderate enantioselectivity towards voluminous aromatic epoxides. However, this particular enzyme presents product inhibition which limits its application. To this end, the aim of this study is to understand the conformational changes that control the efficiency of the enzyme by means of molecular dynamics simulations in three different states: apo, in the presence of substrate (using both enantiomers) and in the presence of product. Molecular dynamics simulations show that all substrates are able to access the active site of the enzyme and to adopt the proper orientation for the reaction. On the other side, all products explore the active site region with less frequency; however, when they arrive at the active site they stay there to inhibit the enzyme. Finally, the formation of a tunnel that connects the substrate entrance region with the product release region has been identified in the simulations.

# Índex

1. Introducció.....	2
1.1. La importància dels enzims .....	2
1.2. Enzim Hidrolasa d'Epòxids (EH).....	3
1.3. Mecanisme de reacció de l'enzim EH.....	4
2. Objectives .....	6
3. Metodologia .....	7
3.1. Protocol de les simulacions.....	7
3.1.1. Dinàmica molecular (MD) .....	7
3.1.2. Dinàmica molecular accelerada (aMD) .....	7
3.2. Anàlisi de resultats .....	8
3.3. Part ètica i sostenible de l'estudi .....	8
4. Resultats i Discussió.....	9
4.1. Dinàmica Molecular de l'enzim en estat apo.....	9
4.2. Dinàmica Molecular de l'enzim en presència de Substrat .....	15
4.3. Dinàmica Molecular de l'enzim en presència del Producte.....	22
4.4. Estudi del túnel de l'enzim .....	26
5. Conclusions.....	28
6. Bibliografia.....	30

# 1.Introducció

## 1.1. La importància dels enzims

Les proteïnes són macromolècules de gran importància en els organismes vius degut a la seves propietats i les diferents funcions que poden realitzar. Generalment, aquestes biomolècules estan involucrades en molts dels processos complexos i importants que tenen lloc a la cèl·lula. Si classifiquem les proteïnes segons la seva funcionalitat, les més estudiades són aquelles que es reconeixen com els catalitzadors més eficients, és a dir, els enzims. A nivell industrial, concretament en la indústria farmacèutica i química fina, és d'especial interès la utilització d'enzims ja que són específics, biodegradables, innocus al medi ambient i poden funcionar en condicions adverses. A més, el seu ús a nivell industrial permetria reduir dràsticament la complexitat dels processos i els passos de purificació necessaris en comparació amb la catàlisi tradicionals.

Tot i que els enzims tenen un gran potencial com a (bio)catalitzadors, encara en molts processos industrials no s'arriben a implementar el seu ús, ja que els enzims extrets directament de la natura no han estat dissenyats per dur a terme la reacció d'interès industrial. Per tant, tot i ser els catalitzadors més eficients de la natura, és necessari modificar l'enzim natural per tal de millorar la baixa activitat envers els substrats no naturals, ampliar el rang de substrats acceptats (com ara, substrats més voluminosos), la baixa regioselectivitat i enantioselectivitat i/o la inhibició per producte.<sup>1</sup> Per aquest motiu és necessari conèixer el funcionament de la proteïna i detectar quins són els aspectes més importants que poden estar implicats en un augment de l'activitat de la proteïna, de la seva estabilitat o selectivitats.

A grans trets, les proteïnes es poden dissenyar seguint dues metodologies: l'evolució dirigida i el disseny racional. En ambdós casos, els actuals protocols que s'utilitzen al laboratori no són suficientment eficients, ja que no s'obté una predicció de quins residus són els importants per millorar l'activitat de l'enzim després d'haver inserit les mutacions. A més, aquest procediment és molt lent i costós. Per aquesta raó, acompanyat de l'augment del poder computacional, s'han pogut desenvolupar nous mètodes alternatius pel disseny d'enzims que permeten obtenir una predicció racional a un cost reduït per poder conèixer les mutacions necessàries que s'han d'inserir a l'enzim per tal d'augmentar la seva eficiència i especificitat.

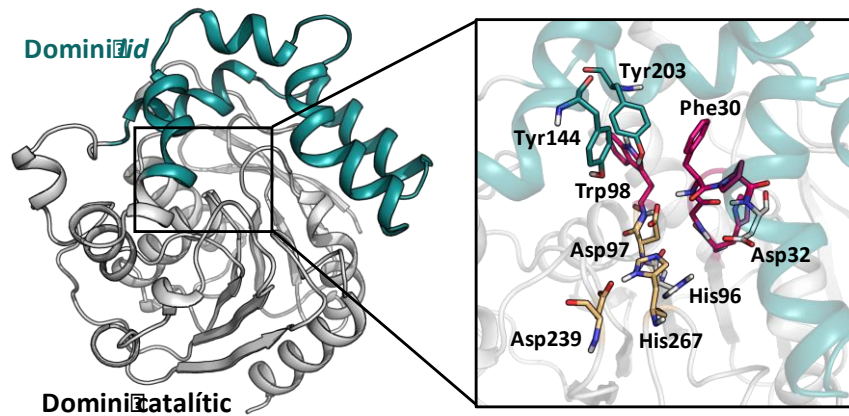
Per últim, cal destacar que les proteïnes no són estructures estàtiques sinó que presenten mobilitat i canvis de conformació tant a nivell global com local que poden determinar l'activitat de la proteïna.<sup>2</sup> Aquest comportament dinàmic es pot estudiar amb utilització d'eines computacionals, com ara les simulacions de dinàmica molecular que mostren les conformacions que viatja la proteïna al llarg del temps de simulació.

## 1.2. Enzim Hidrolasa d'Epòxids (EH)

Aquest treball es basa en l'estudi computacional de l'enzim hidrolasa d'epòxid (EH) que prové del *Bacillus megaterium*. Generalment, els enzims EHs es troben en un gran nombre d'organismes com ara els mamífers, insectes, plantes i microorganismes.<sup>3</sup> Aquest enzim pot participar en diferents funcions tals com la desintoxicació de compostos xenobiòtics, funcions catabòliques o senyalització cel·lular.<sup>4</sup>

En els últims anys aquest enzim hidrolític s'ha convertit en un catalitzador de gran interès, ja que és capaç de realitzar la hidròlisi de la mescla racèmica d'epòxids.<sup>5</sup> Segons l'organisme d'origen, les diferents EHs comparteixen el mateix mecanisme però poden presentar enantioselectivitats i regioselectivitats diferents. Aquestes propietats fan que les EHs siguin de gran interès per a la comunitat científica, ja que poden utilitzar-se per a la síntesi de diferents precursors de molts productes d'interès per l'industria farmacèutica, utilitzant mescles racèmiques com a punt de partida.<sup>6,7</sup>

L'estructura de la majoria d'EHs pertanyen a la família de  $\alpha/\beta$ hidrolases.<sup>8</sup> Aquesta família d'enzims està constituïda generalment per dos dominis: i) el domini hidrolític (o catalític), el qual està compost per làmines beta altament conservades que es troben al centre de l'enzim i envoltades d'hèlix alfa i, ii) un domini més flexible format d'hèlix alfa que es troba a la part superior del centre actiu formant el domini "tapa", generalment més conegut com a domini *lid* (veure Figura 1).

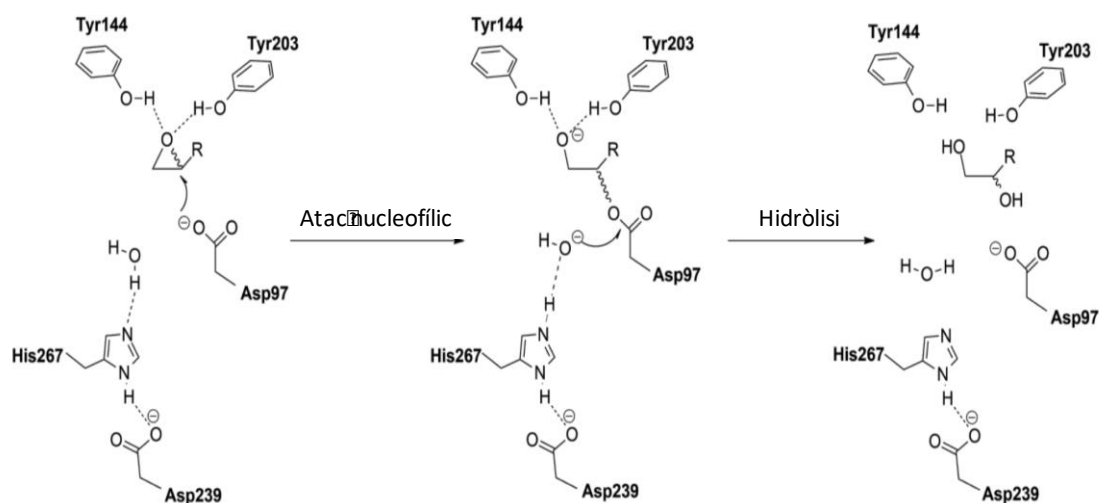


**Figura 1.** Representació de l'estructura tridimensional cristal·logràfica (PDB: 4NZZ) de l'enzim hidrolasa d'epòxids (EH) que prové del *Bacillus Megaterium*. En format *sticks* es representen els residus del centre actiu seguint la numeració de la seqüència peptídica del 4NZZ. En color groc es representa la tríada catalítica, en color turquesa els dos residus implicats en el reconeixement del substrat, en color rosa els residus que formen l'oxoanió (HGFP) i també el Trp98 implicat en l'estabilització de l'oxoanió. En gris s'indiquen dos residus extrems com a representació d'altres residus propers al centre actiu que poden tenir un paper rellevant.

### 1.3. Mecanisme de reacció de l'enzim EH

El centre actiu està constituït per la tríada catalítica, formada per l'Asp97, His267 i l'Asp239 i les dues tirosines (Tyr144 i Tyr203) localitzades en el *lid*, les quals són essencials per l'activitat de l'enzim, ja que permeten reconèixer el substrat i estabilitzar l'oxigen de l'anell de l'epòxid en el primer pas de la reacció.<sup>9</sup> A més, altres estudis d'EHS destaquen la presència d'altres residus propers al centre actiu (His96 i Asp32) que poden tenir un paper important per a la catàlisi.<sup>11</sup> L'Asp97 és el residu que produirà l'atac nucleofílic i es troba en un *loop* (conegut com el *nucleophilic elbow*), que és adjacent al *loop* que conté els residus que constitueixen l'oxianió (HGFP). Tots aquests residus del centre actiu són característics d'aquesta classe d'enzims ja que es troben molt conservats en la majoria de les EHS.

Generalment, l'obertura de l'anell de l'epòxid té lloc a través d'un mecanisme que consisteix en dos passos. En el primer pas l'Asp97 ataca regioselectivament un dels carbonis de l'anell de l'epòxid donant lloc a un intermediari unit covalentment a l'enzim. Aquest intermediari èster és hidrolitzat en el segon pas per una molècula d'aigua prèviament activada per la His267. En aquest pas es genera un intermediari tetraèdric que ràpidament es reorganitza per formar el diol i regenerar el centre actiu (veure Figura 2).

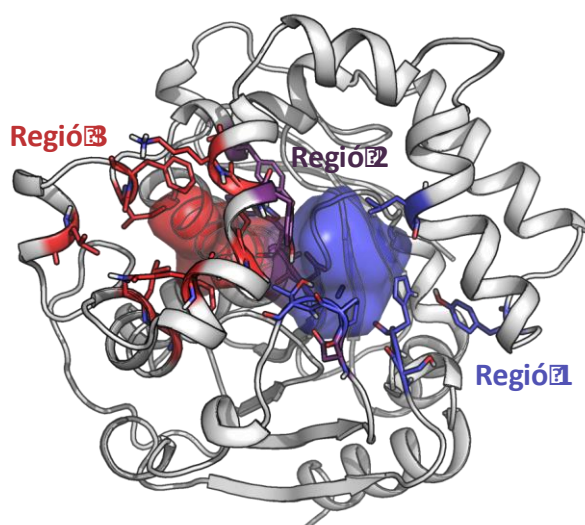


**Figura 2.** Esquema general del mecanisme de reacció de les EH. L'esquema numèric fa referència a la seqüència peptídica amb codi PDB 4NZZ.

A diferència d'altres enzims, experimentalment s'identifiquen tres regions de l'enzim hidrolasa d'epòxids que podrien formar un túnel que connecta la regió d'entrada del substrat amb la sortida del producte. La regió que està formada pels residus Leu168, Tyr178, Pro240, Thr241, Ser266 i la catalítica His267 es defineix com la regió 1. Aquesta s'identifica com l'entrada del substrat per arribar al centre actiu. D'altra banda, la regió que està constituïda pels residus Met145, Phe128, Ile208 i Ser142 es defineix com la regió 3. Aquesta regió és caracteritzada

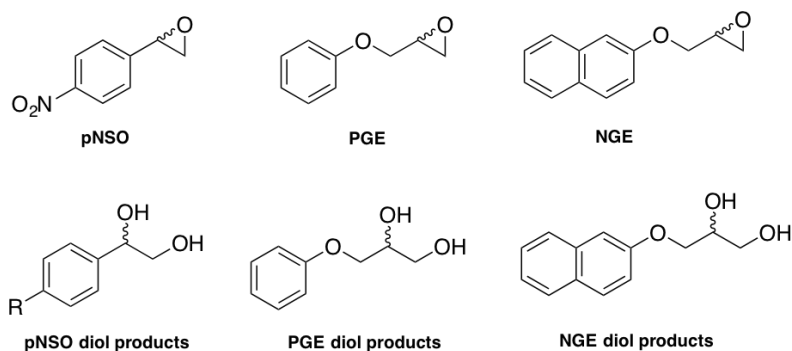


perquè els residus Gln139, Leu132, Phe209, Lys146 i Leu214 formen les parets laterals de la cavitat contigua a la regió 2 (centre actiu), a través de la qual s'alliberaria el producte. Per tant, la regió 1 i la 3 estan connectades per un túnel.



**Figura 3.** Representació del túnel del centre actiu de l'enzim hidrolasa d'èpoxids que prové del *Bacillus megaterium*. En mode *cartoon* es representa l'estructura tridimensional de l'enzim i en mode *sticks* els residus que formen les corresponents regions 1) en blau, 2) lila i 3) en vermell. En mode *Surface* es representa el túnel que connecta la regió 1 (entrada del substrat) amb la regió 3 (alliberament del producte).

Tal i com s'ha comentat, concretament s'estudia la hidrolasa d'èpoxid provinent del *Bacillus megaterium* (BMEH), ja que presenta certes propietats que la fan més prometedora per obtenir precursors de productes farmacèutics més voluminosos per la indústria química (precursor propanolol, naftil glidicil eter).<sup>1</sup> En aquest treball s'insereixen diferents mutacions a l'enzim *wild-type*: la Met145Ala i la Phe128Ala. Aquests residus estan localitzats a la regió de la sortida del producte. Aquestes dues mutacions permeten augmentar el volum en aquesta regió, facilitant l'obtenció dels productes per un dels enantiòmers en qüestió. En un altre treball experimental es demostra que tant l'enantiopreferència com la regioselectivitat depenen de l'estructura del substrat (Veure Esquema 1).<sup>11</sup>



**Esquema 1:** Estructures dels substrats i productes utilitzats en aquest estudi.

## 2. Objectives

Epoxide Hydrolase are versatile enzymes that have been used to generate precursors of many interesting molecules for the pharmaceutical and fine chemistry industries. In the last years, several efforts have been put to design more effective and selective EHs that facilitate the enantioselective ring opening reaction of racemic mixtures of epoxides to produce vicinal diols. For example, a wild type EH from *Bacillus megaterium* has been shown to be a powerful and effective enzyme for the enantioselective catalysis of asymmetric and symmetric epoxides. One of the significant features of these enzymes is that the substrate access and the product release regions are connected through a tunnel. In addition, this enzyme suffers from product inhibition, which can slow down the reaction. The mechanism by which the enzyme controls the enantioselectivity of the reaction and how the product can act as an inhibitor is still unknown.

Enzymes are flexible molecules that are able to explore a wide range of conformations that may be altered by the presence of the substrate or the product. Therefore, protein dynamics plays a critical role in understanding enzyme catalysis particularly in this case where the presence of a product release tunnel has been postulated.

The main goal of the current study is to understand protein dynamics of the EH enzyme by means of molecular dynamics simulations in three different states: apo, in the presence of the substrate, and in the presence of the product. In all cases both the substrate and the product will be placed around the enzyme. To accomplish this goal the global and local flexibility of the protein will be explored by means of different techniques. These analyses will explain the inherent behavior of the protein that will provide an explanation for the following goals:

1. To know if it is possible to observe the entrance of different substrates into the active site by means of molecular dynamics simulations (MD). To answer this question:
  - 1.1. The proper positioning of the substrate in the active site for different types of epoxides and their respective enantiomers will be analyzed for all simulations.
  - 1.2. The enantiopreference of each substrate will be discussed.
2. To verify if the product release is the limiting-step of the reaction and the enzyme is suffering product inhibition.
3. To identify the presence of a tunnel that connects region 1 (substrate entrance) and 3 (product release) by means of measuring the volume of that regions.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Protocol de les simulacions

Per a començar pròpiament la simulació de dinàmica molecular (MD) a partir de les coordenades al PDB 4NZZ cal equilibrar prèviament el sistema a les condicions de simulació. El procediment d'equilibració, consta de tres fases:

- **Minimització.** Procés que es duu a terme en dos passos: i) en el primer s'optimitza la posició del solvent (aigua) i dels ions amb l'estructura proteica fixada, ii) en el segon, s'optimitza la posició dels àtoms del sistema complet per tal d'obtenir una conformació inicial més estable.
- **Heating.** Procés que consisteix en augmentar progressivament la temperatura de 0K a 300K, donant energia cinètica al sistema minimitzat per tal d'iniciar el moviment dels àtoms que componen el sistema dinàmic. Aquest procés es realitza en condicions de volum constant.
- **Equilibració.** Procés que es realitza a pressió constant permetent que el volum canviï de manera que la densitat del solvent (aigua) es relaxi i s'adapti a les condicions del sistema (temperatura 300 K).

##### 3.1.1. Dinàmica molecular (MD)

Una vegada el sistema està equilibrat es procedeix a realitzar pròpiament la simulació de dinàmica molecular. Aquesta fase és equivalent a l'equilibració realitzada anteriorment, però es realitza a volum constant i per un període de temps de simulació major. En aquest pas, es pretén relaxar l'estructura de l'enzim fins a arribar a una conformació més estable respecte el punt inicial.

S'envien simulacions de dinàmica molecular de 200 ns pels sistemes en estat *apo*, en presència de substrat i del producte utilitzant el camp de forces *ff99SB* amb AMBER. De cadascuna d'aquestes simulacions es realitzen dues rèpliques addicionals també de 200 ns. Per tant, les simulacions que s'han realitzat són les següents:

- **Apo:** 3 rèpliques x 200 ns
- **Substrats:** 3 rèpliques x 200 ns pel (S)-PGE, (R)-PGE, (S)-NSO, (R)-NSO, (S)-NGE, (R)-NGE.
- **Productes:** 3 rèpliques x 200 ns pel (S)-PGD, (R)-PGD, (S)-NSD, (R)-NSD, (S)-NGD, (R)-NGD.

##### 3.1.2. Dinàmica molecular accelerada (aMD)

Per tal de mostrejar més conformacions de l'enzim hidrolasa d'epòxids (EH) que les visitades durant les simulacions anteriors, es realitzen simulacions de dinàmica molecular accelerada (aMD). Es comença la simulació d'aMD a partir de l'estructura final de les rèpliques de les simulacions de dinàmica molecular (MD) de 200 ns del sistema on hi ha el producte.

La dinàmica molecular accelerada permet fer l'estudi de sistemes biomoleculars en escales de temps d'ordre de magnitud major que els accessibles amb la dinàmica molecular (MD) permetent un ampli mostreig de les diverses conformacions amb un cost computacional menor.

### 3.2. Anàlisi de resultats

S'han emprat diversos mètodes i eines computacionals per a l'anàlisi dels resultats. Primer s'ha realitzat un anàlisi visual, en el que s'han visualitzat les trajectòries amb el programa VMD (Visual Molecular Dynamics), dissenyat per a modelar, visualitzar i analitzar sistemes biològics. Cal esmentar que també s'ha utilitzat el programa VMD per a la preparació inicial dels sistemes en presència de substrat i/o producte. Aquest programa permet decidir les coordenades inicials del substrats i/o producte al voltant de l'enzim col·locant-los aproximadament a una distància de 20 Å.

Per tal d'explorar si les conformacions mostrejades durant les simulacions de dinàmica molecular i accelerada diferien estructuralment del punt inicial, s'han calculat el *root mean square deviation* (RMSD) al llarg de la simulació com una mesura de la mobilitat del *backbone* de l'enzim. També s'ha mesurat el *root mean square fluctuation* (RMSF) per tal d'identificar a nivell local quines eren les regions més flexibles de l'enzim. A més, per aprofundir en aquest anàlisi estructural, també s'ha emprat el programa Bio3D per identificar i determinar quins dels moviments globals i locals descriuen els components principals (PC). Aquest anàlisi dels components principals (PCA) permet identificar patrons estructurals que es repeteixen al llarg de la simulació de dinàmica molecular i expressar-los mostrant les seves similituds i diferències.

Per a analitzar el túnel que es genera en les simulacions de dinàmica molecular i accelerada s'utilitza el programa POVME per tal de mesurar el volum en cadascuna de les conformacions visitades.

Per a l'elaboració de les imatges s'utilitza el programa PyMOL.

### 3.3. Part ètica i sostenible de l'estudi

En l'estudi de la EH només s'ha utilitzat eines computacionals, les quals no generen cap mena de residus, per aquest motiu es considera una pràctica respectable amb el medi ambient. També, des de el punt de vista de l'estudi realitzat, s'està incentivant a la utilització de la de EH, un compost innoeu i biodegradable, perquè sigui utilitzat per la indústria química .

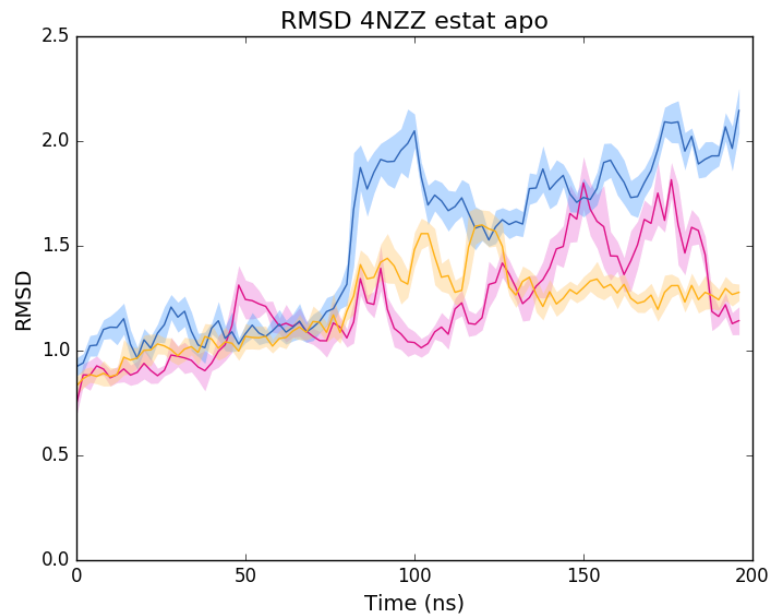
## 4. Resultats i Discussió

L'apartat de resultats es divideix en les següents seccions:

### 4.1. Dinàmica Molecular de l'enzim en estat *apo*

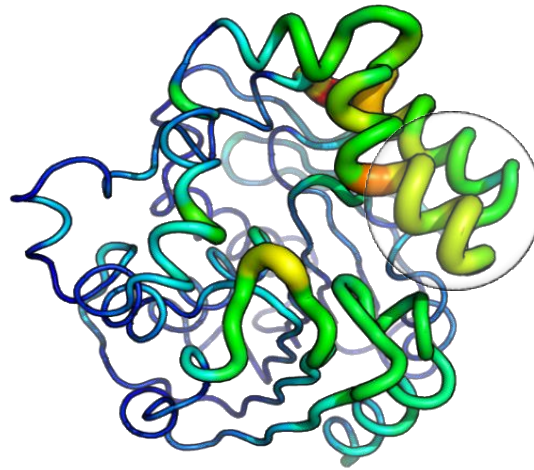
El primer estudi es realitza amb l'enzim hidrolasa d'epòxids en estat *apo*, és a dir, sense presència de lligand, on es realitzen tres dinàmiques moleculars (MD) de 200 ns partint de la l'estructura de la proteïna cristal·litzada (PDB: 4NZZ). A través de les simulacions de dinàmica molecular es podrà observar el comportament dinàmic de l'enzim en absència de lligand, d'aquesta manera es podran explorar les conformacions de la proteïna i el grau de flexibilitat de les diferents regions. Segons el concepte de selecció conformacional, un enzim en estat *apo* és capaç d'explorar totes les conformacions possibles que aquest pot adoptar, tot i que hi ha conformacions que es visiten menys freqüència que d'altres. En general, la presència de substrat o producte limita les conformacions adoptades per l'enzim, fet que pot provocar l'estabilització o desestabilització de conformacions que promouran la catàlisi. Per aquest motiu, en primer lloc s'estudia la proteïna en estat *apo* per tal d'identificar la dinàmica inherent de l'enzim.

En primer lloc, s'utilitza la mesura coneguda com a *root mean square deviation* (RMSD) per analitzar els canvis estructurals globals que tenen lloc a les tres rèpliques de MD. Aquesta mesura ens permet quantificar els canvis que tenen lloc a la proteïna respecte la conformació inicial de la dinàmica. Com més gran és el valor de RMSD, més diferència hi haurà entre les dues conformacions. Com es pot veure generalment a la Figura 4, aquests valors difereixen poc de l'estat inicial. Tot i que, per una de les rèpliques s'obtenen valors de RMSD més elevats, indicant que s'arriba a explorar conformacions que difereixen significativament de la inicial. Tot i això, a nivell global no s'observen canvis rellevants, suggerint que l'eficiència de l'enzim pot venir determinada per canvis locals associats a moviments de cadenes laterals dels residus o regions específiques de l'enzim.



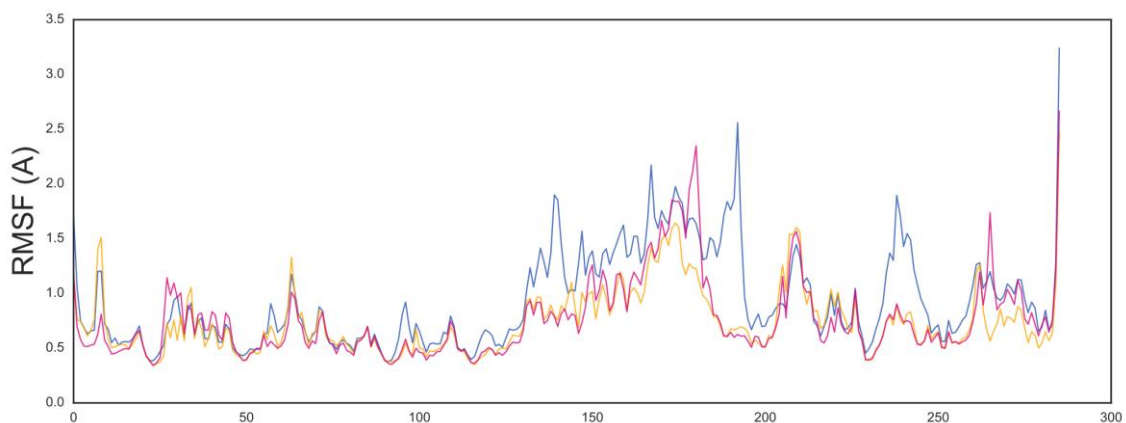
**Figura 4.** Representació del *root mean square deviaton* (RMSD) de la simulació de l'enzim 4NZZ en estat *apo* rèplica 1 (rosa), rèplica 2 (blau) i rèplica 3 (groc).

Per tal d'identificar els moviments més rellevants que tenen lloc localment en aquestes tres simulacions, s'utilitza l'anàlisi dels components principals (PCA) (veure Metodologia). En cap de les tres rèpliques hi ha un moviment que predomini sobre la resta, indicant l'alta mobilitat de diferents regions de la proteïna i la poca correlació entre aquests moviments. Tot i així, els moviments principals suggereixen que la part més mòbil és el *lid*, en concret, aquells residus que ocupen les posicions 165-194 de la seqüència polipeptídica (indicat en un cercle a la Figura 5). El *lid* conté les dues tirosines (Tyr144 i Tyr203) responsables del reconeixement del substrat i el correcte posicionament d'aquest al centre actiu per permetre l'activació de l'oxigen de l'epòxid. A més, també presenten mobilitat els *loops* que contenen dos dels residus de la tríada catalítica, l'Asp239 i l'His267. Per tant, l'anàlisi del component principal demostra que existeix una correlació entre el moviment del *lid* i els *loops* importants que contenen els residus importants per a la catàlisi. En canvi, la regió formada pels residus que ocupen les posicions de l'1 al 131, representada de color blau a la Figura 5 no s'observa mobilitat en cap de les tres rèpliques. També és destacable que el moviment del *lid* promou l'obertura o tancament de la regió 1 (veure Introducció), que correspon *a priori* a l'entrada del substrat. Per tant, a partir de l'anàlisi dels components principals es pot concloure que l'enzim sense presència de substrat pot adoptar una conformació òptima per iniciar la reacció. Tot i així, el primer component no mostra mobilitat a la regió 3 associada amb la sortida del producte, fet que no implica que sigui un moviment important en altres components. Aquest fet pot indicar que aquests dos moviments no estan correlacionats.



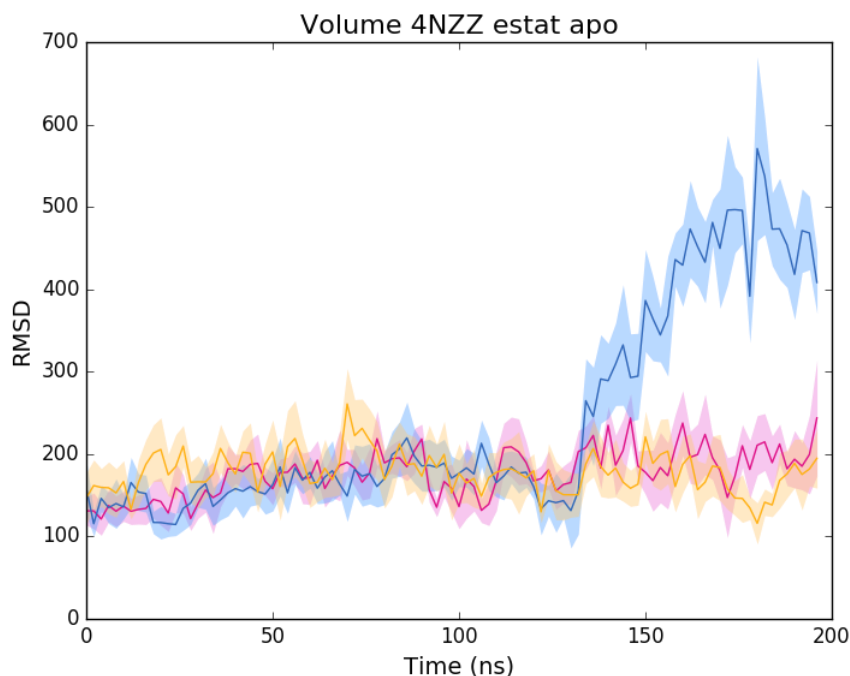
**Figura 5.** Representació dels moviments principals de l'enzim en estat *apo*, on es destaca el moviment de l'extrem del Lid per presentar una alta mobilitat.

Per tal d'aprofundir en els moviments locals de l'enzim, es mesura la fluctuació dels residus (RMSF) al llarg de les simulacions de dinàmica molecular (veure Figura 6). Aquesta gràfica indica que els residus que conformen el *lid*, són els que presenten més mobilitat dins la proteïna. A més, també s'observa alta mobilitat en tres regions que contenen els residus responsables de la catàlisi. Aquestes regions corresponen al *loop* que conté l'Asp239, el qual forma part de la tríada catalítica, la regió corresponent a l'oxoanió (HGFP) i al *loop* que podria promoure la sortida del producte. Aquestes fluctuacions s'observen en les tres rèpliques. El moviment d'aquestes regions és rellevant, ja que indica que, en l'estat *apo* de l'enzim, s'està explorant tant la conformació que pot presentar activitat com inactivitat catalítica. Cal destacar que aquest enzim pateix inhibició per producte. L'alta flexibilitat del *loop* de la regió de la sortida del producte sembla indicar que aquesta regió no està implicada en aquest procés d'inhibició. Si aquesta regió és mòbil no impedirà que el producte pugui sortir del centre actiu després de donar-se la reacció de l'obertura de l'epòxid. Per tant, aquests resultats mostren que la inhibició per producte pot venir donada per algun altre motiu.



**Figura 6.** Representació del *root mean square fluctuation* (RMSF) de la rèplica 1 (rosa), 2 (blau) i 3 (taronja) de la simulació de l'enzim 4NZZ en estat *apo*.

En general, a partir de les simulacions de dinàmica molecular es pot concloure que les regions més mòbils corresponent al *lid* i els *loops* que contenen els residus catalítics. En la segona rèplica de MD s'observa com l'enzim presenta major fluctuació d'aquestes dues regions, les quals poden delimitar l'accés del substrat al centre actiu. Per tal d'explorar amb més detall els canvis conformationals dels residus que formen aquestes dues regions, es mesura també el volum del centre actiu. Tal i com es pot veure a la Figura 7, el volum fluctua àmpliament al llarg de la simulació, passant de valors d'entre 200-300 a 700 Å<sup>3</sup>. Concretament, l'augment sobtat del volum en el centre actiu és causat principalment pel moviment de la Tyr144 (Figures 7 i 8). El volum del centre actiu augmenta degut a aquest residu canvia d'una orientació òptima per a la catàlisi a posicionar-se cap a l'exterior del centre actiu. Conseqüentment, es produeix el moviment del *backbone* d'aquella regió, el qual porta a l'obertura del *lid* i d'aquesta manera es podria facilitar l'entrada del substrat. Tot i que aquest moviment permet accedir al centre actiu, també s'ha de tenir en compte que els residus han d'estar correctament posicionats per a la catàlisi. Com que la Tyr144 participa en el reconeixement del substrat, aquest canvi d'orientació comporta un posicionament incorrecte dels residus alhora de dur a terme l'activació de l'epòxid. De manera que, la reacció catalítica no es donaria. Aquestes observacions semblen indicar que l'entrada del substrat, facilitada per l'augment de volum del centre actiu, es produeix a través d'una conformació catalíticament inactiva.

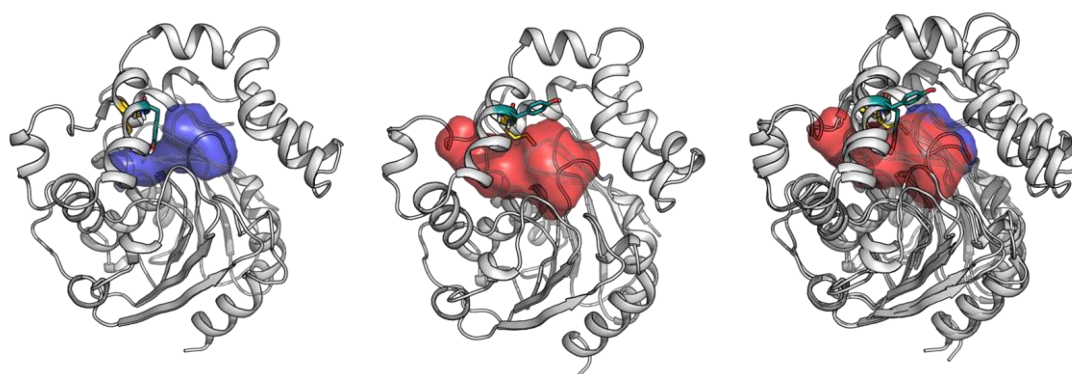


**Figura 7.** Representació del volum de la rèplica 1 (rosa), 2 (blau) i 3 (taronja) de la simulació de l'enzim 4NZZ en estat *apo*.

Fins aquest moment, s'ha observat la obertura de la regió associada al centre actiu i el moviment del *loop* corresponent a la regió de sortida del producte. Segons Kong i

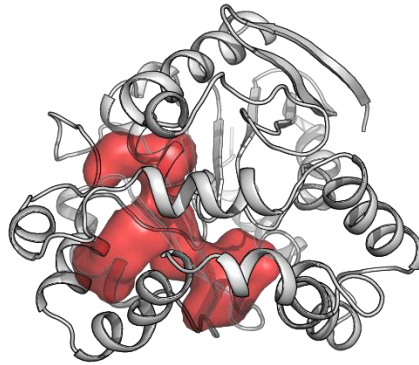


col·laboradors<sup>1</sup> aquestes dues regions estan connectades formant un túnel que permetria l'entrada del substrat per la regió 1 i la sortida del producte per la regió 3. Per tal d'explorar l'existència d'aquest túnel en l'estat *apo* de la proteïna es calcula el volum d'aquestes dues regions utilitzant el programa POVME (veure Metodologia) al llarg de la simulació. L'anàlisi del volum ha permès identificar la formació del túnel i els residus implicats en el procés d'obertura. El túnel es forma en algun dels fotogrames de la simulació degut a el moviment de la Met145 i el Trp98 que permeten connectar la regió d'entrada de substrat amb la de sortida del producte. El canvi de conformació de la Met145 es produeix només quan la Tyr144 adopta la conformació allunyada del centre actiu, permetent a la Met145 ocupar l'espai que ha deixat la Tyr144 (Figura 8).



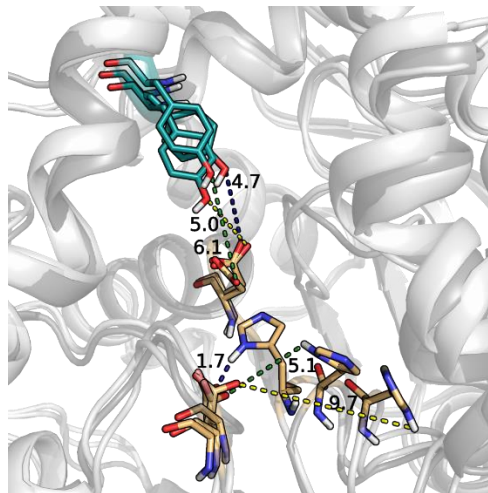
**Figura 8.** Representació del volum de la rèplica dos de la simulació de l'enzim 4NZZ en estat *apo* en dos fotogrames diferent. En la primera imatge la Tyr144 (blau) i la Met145 (groc) estan en la conformació habitual, impeding la generació del túnel (representat amb el volum de color blau). En la segona imatge es representa la fluctuació d'aquests dos aminoàcids i es pot generar un volum més gran (vermell) i la presència del túnel. En la tercera imatge es representa el solapament de les dos imatges anteriors.

En el transcurs de les diferents simulacions, el moviment de la Tyr144 sembla poc freqüent ja que només s'ha explorat en una de les tres rèpliques. En les altres dues, no s'observa el canvi de conformació d'aquest residu ni de la tríada catalítica, per aquest motiu no s'observen canvis destacables en el volum del centre actiu. Tot i això, el túnel que connecta les dues regions també és present en les dues rèpliques, tot i que no s'observa suficient espai com perquè el substrat o producte puguin travessar-lo. Aquest fet és degut a la poca fluctuació dels residus Tyr144, Met145, i Phe242. En funció de la rèplica s'exploren diferents conformacions. Durant tot el temps de simulació de la primera rèplica els túnels s'observen amb poca freqüència. Per contra, durant el temps de simulació de la tercera rèplica, no només s'observa majoritàriament la formació de l'esmentat túnel, sinó que també es forma un túnel amb dues rutes de sortida possibles. A diferència del que s'havia postulat fins ara, cal destacar que les simulacions de dinàmica molecular semblen indicar que el producte pot tenir diferents vies de sortida (Figura 9). Aquestes observacions es discutiran amb més detall a l'apartat 4.4.



**Figura 9.** Representació del volum de la rèplica tres de la simulació de l'enzim 4NZZ en estat *apo* on s'observa el volum (vermell) indicant dos vies de sortida-

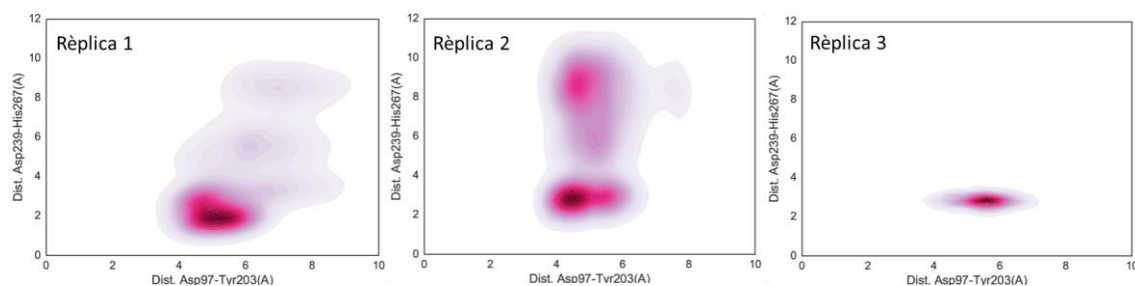
Després d'observar la presència del túnel que connecta les dues regions també es vol analitzar si en l'estat *apo* els residus implicats en dur a terme la reacció es troben correctament posicionats per a realitzar la catàlisi durant la simulació. Per extreure aquesta informació es mesuren les distàncies entre els residus del centre actiu (els dos residus de la tríada Asp239-His267 i la Tyr203 del *lid* amb l'Asp97 nucleòfil) al llarg de la simulació (Figura 10). Per tal de dur a terme l'obertura de l'epòxid, els residus s'han de trobar propers en l'espai, és a dir, a una distància menor de 4 Å



**Figura 10.** Representació de les distàncies definides entre Asp239-His267 (groc) i Tyr203-Asp97 (blau) de la simulació de la rèplica 1 de l'enzim 4NZZ en estat *apo*. On s'indiquen les tres possibles conformacions que adopta la His267.

Tal i com s'observa en les Figures 9 i 10, en les simulacions de l'enzim hidrolasa d'epòxids en estat *apo* s'explora la conformació catalíticament activa. A més, visita altres conformacions en les que les distàncies són superiors a 4 Å. Cal destacar que la His267 explora tres conformacions diferents: a) una pròxima a l'Asp239, b) a una distància intermèdia, i c) allunyada de l'Asp239 i de la resta de residus del centre actiu. Només la a) és catalíticament activa. Com es pot veure a la Figura 11, la conformació activa és la més explorada durant les simulacions en estat *apo*. Aquestes observacions estan relacionades amb el volum del centre

actiu, el qual és superior amb la conformació c) de la histidina (la conformació inactiva). Aquest comportament indicaria la necessitat de que l'enzim es trobi en estat inactiu per tal de poder generar el suficient volum perquè pugui entrar el substrat o sortir el producte.



**Figura 11.** Representació de les gràfiques de les distàncies entre Asp239-His267 i Tyr203-Asp97 de les simulacions de les tres rèpliques de l'enzim 4NZZ en estat *apo*. A cada gràfica s'ha identificat a quina rèplica correspon.

## 4.2. Dinàmica Molecular de l'enzim en presència de Substrat

Un cop realitzat l'anàlisi de les simulacions de dinàmica molecular de l'enzim en estat *apo*, es procedeix a simular el procés d'unió entre el substrat i l'enzim. Per tal de comprendre quin és el mecanisme d'entrada del substrat i quins canvis conformationals provoca a l'enzim. Tal i com s'ha mencionat a l'apartat de metodologia es realitzen dos protocols de simulació diferents. En un s'introdueixen quatre molècules del mateix substrat (o l'enantiòmer R o l'enantiòmer S) a l'exterior de la proteïna i en l'altre dues molècules de cada un dels enantiòmers (mescla racèmica).

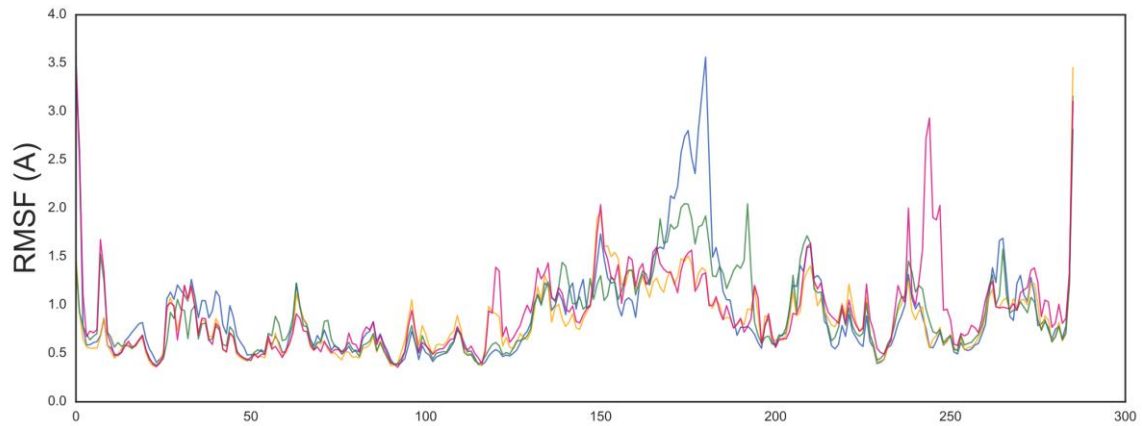
La hidrolasa d'epòxids pot actuar selectivament sobre un ampli ventall de substrats racèmics que continguin el grup funcional epòxid a la seva estructura. En aquest cas, hem seleccionat tres substrats racèmics. S'han escollit aquests substrats perquè un dels enantiòmers d'aquests substrat són precursors de fàrmacs que s'utilitzen per tractar les malalties cardiovasculars, com ara el propranolol i l'alprenolol (veure Introducció).

En aquestes simulacions les 4 molècules de substrat es situen al voltant de la proteïna a 20 Å. del centre actiu amb la finalitat de no imposar que els substrats accedeixin o ja es trobin des d'un inici de la simulació dins del centre actiu. Amb aquest sistema d'inici sense restriccions, un dels objectius del treball és comprovar si la dinàmica molecular és una tècnica apropiada per a descriure el mecanisme entre un substrat i el seu enzim. A través de les simulacions es podrà estudiar d'una banda, quines interaccions s'estableixen realment per les propietats inherents tant de l'enzim com dels propis substrats, i d'altra banda, si la presència d'aquests provoca canvis conformationals com ara, l'obertura o tancament del *lid*. A més, també es podrà estudiar quin dels dos enantiòmers es posiciona correctament respecte els residus catalítics per tal de dur a terme la reacció.

Com en el cas de les simulacions de l'enzim en estat *apo*, també es mesura la RMSD, RMSF, el volum del centre actiu i es realitza l'anàlisi dels moviments principals (PCA) per tal d'identificar si els substrats han provocat canvis conformacionals en l'enzim d'hidrolasa d'epòxids.

Els resultats obtinguts del RMSD per a cada una de les diferents rèpliques i el comportament que s'observa de l'enzim en totes les simulacions sembla indicar que no existeix una relació entre l'augment del valor de RMSD i la fluctuació del volum al llarg de la simulació o d'interacció del substrat o les conformacions que adopta respecte les dos distàncies catalítiques més importants. Aquest fet demostra que la capacitat de catàlisi de l'enzim no ve determinada per canvis globals (mesurats a través de l'RMSD) sinó per canvis a nivell local, com moviments del *lid* o canvis de conformació de les cadenes laterals dels residus.

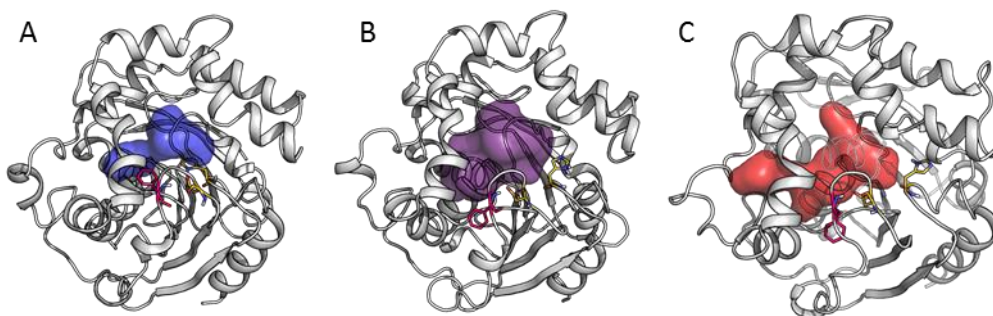
Com s'ha vist en l'estat *apo* de l'enzim, en aquestes simulacions tampoc s'observa una diferència en la fluctuació del *backbone* de l'enzim (veure Figura 12). Per tant, la proteïna sense substrat presenta alta mobilitat, la qual cosa significa que no requereix establir interacció amb una molècula de substrat per adoptar la conformació activa. Així, els canvis estructurals que es van produint per ella mateixa en estat *apo* són els que permeten que el substrat accedeixi en el centre actiu. Aquesta observació està en concordança amb la teoria de selecció conformacional, on el lligand només interaccionarà amb la proteïna quan aquesta es trobi en la conformació adequada. Un cop el substrat es troba al centre actiu, l'enzim presenta, en general, menys mobilitat. Per tant, el volum que genera la proteïna en estat *apo* és suficient per a que el substrat pugui accedir al centre actiu i mantenir interaccions amb el residus catalítics. Durant aquestes simulacions, s'observen certs moviments característics de les cadenes laterals de la Tyr144, Tyr203, Asp239, His267, Trp98 i Phe242, tot i que no es pot afirmar que aquests canvis locals estiguin provocats per la presència de substrat. Aquests canvis en les cadenes laterals s'observa com poden afavorir a la generació de més volum en el centre actiu com impedir una conformació catalíticament activa.



**Figura 12.** Representació del *root mean square fluctuation* (RMSF) de la rèplica 1 (rosa), 2 (blau) i 3 (taronja) de la simulació de l'enzim 4NZZ amb l'enantiòmer S del NGE i de la mitjana de les tres rèpliques de la simulació de l'enzim 4NZZ en estat *apo*.

Si s'analitzen aquests moviments locals en més detall s'observa el següent:

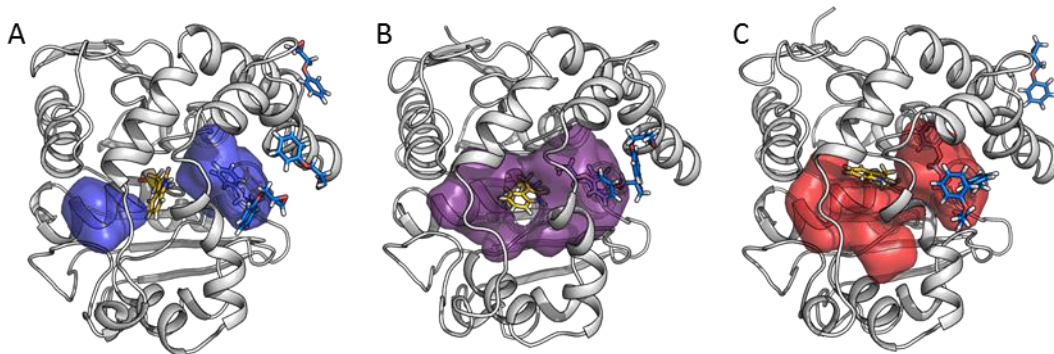
- Canvi de conformació que provoca l'allunyament de la Tyr144 del centre actiu. A les simulacions s'observa que aquest residu és el responsable de reconèixer l'oxigen de l'epòxid per facilitar l'entrada del substrat al centre actiu. Per tant, aquest fet sembla indicar que la Tyr144 juga un paper important en la selectivitat de l'enzim. Tot i que, segons la bibliografia és la Tyr203 la responsable de transferir l'hidrogen a l'oxigen de l'epòxid per iniciar el procés d'obertura.
- Trencament de l'enllaç d'hidrogen entre la His267 i l'Asp239. Aquests residus formen part de la tríada catalítica. S'assumeix que per a què es porti a terme la reacció la interacció entre aquests dos residus s'ha de mantenir. Per tant, el trencament d'aquesta interacció porta a una conformació catalíticament no activa, tal i com s'ha observat a les simulacions en estat *apo*. A la Figura 13 s'observa l'alt grau de moviment de la His267, generant tres conformacions. Aquest trencament permet la fluctuació cap a l'exterior del *loop* que conformen els residus 231-252, permeten que la Phe242 no estigui inhibint la formació del túnel.



**Figura 13.** Representació de l'augment del volum per la fluctuació de la His267 (groc) en perdre la interacció amb el Asp239 provocant l'allunyament de la Phe242 del centre actiu. **A)** La His267 està interaccionant amb l'Asp239 i la Phe242 està orientat cap al centre actiu produint la generació de poc volum (blau). **B)** La His267 perd la

interaccionant amb l'Asp239 i la Phe242 s'allunya del centre actiu produint l'augment del volum (lila). **C**) La His267 segueix en la conformació més allunyada a l'Asp239, provocant una major mobilitat del *loop* del Asp239 i permetent que la Phe242 pugui seguir allunyant-se del centre actiu per facilitar l'augment del volum (vermell) i la formació del túnel.

- c. Fluctuació del Trp98, residu contigu a l'Asp97 catalític i orientat cap al túnel de sortida del producte. Aquest aminoàcid presenta una alta mobilitat al llarg de la simulació, fet que sembla indicar que aquest aminoàcid és clau per generar espai suficient per a que es produeixi el túnel. El triptòfan és un residu voluminós que pot actuar com a comporta reguladora de la sortida del producte i afavorir el correcte posicionament del substrat, intermedis i productes (Figura 14).

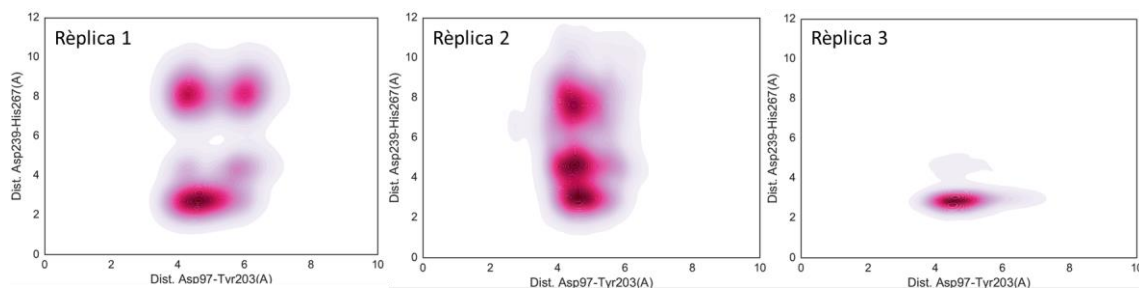


**Figura 14.** Representació dels canvis conformacionals de la cadena lateral del Trp98 al llarg de la simulació del enzim 4NZZ amb la presència de l'enantiòmer R del PGE . El Trp98 de color groc i el PGE de color blau es mostren amb *sticks*. La simulació es representa de A a C, amb l'augment de volum de més petit (blau) a més gran (vermell), amb el volum entremig (lila).

- d. Desplaçament del *backbone* on es localitza la Tyr203 cap a la regió més superficial de l'enzim. Aquest residu és clau per a que es doni la reacció i estabilitzar l'oxigen de l'epòxid, tal i com s'ha comentat anteriorment. El moviment d'aquest residu produeix un augment de volum en el centre actiu connectant així la regió d'entrada del substrat amb el túnel de sortida del producte. Aquest moviment implica un augment de la distància amb l'Asp97 i per tant, una conformació no activa del centre actiu.

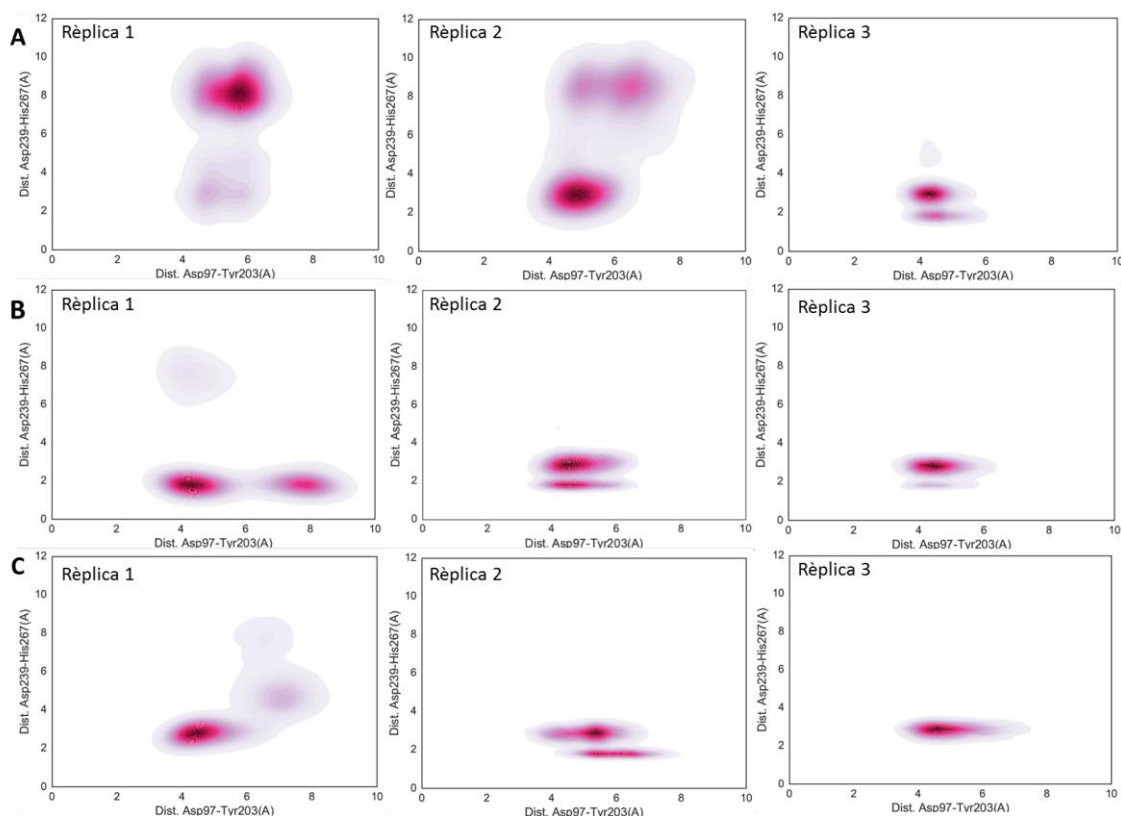
Cal destacar que quan el substrat accedeix al centre actiu i interacciona amb els residus amb valors de distàncies compreses en el rang de 0 – 6 Å, no s'observen canvis estructurals locals ni tampoc l'estabilització del *lid*, fet que sembla indicar que aquesta regió de l'enzim no ha perdut mobilitat. Per tant, els resultats mostren que les diferències estructurals que atorguen estats conformacionals amb predisposició a l'entrada del substrat són produïts per canvis puntuals en les cadenes laterals dels residus esmentats anteriorment. Aquests moviments característics s'observen quan es realitzen les simulacions amb la presència d'un sol enantiòmer. De la mateixa manera que s'ha observat en estat *apo*, la His267 pot adoptar tres conformacions diferents (veure Figura 15). Tot i que, la presència de substrat disminueix la probabilitat de trobar-se a la conformació activa respecte a la simulació en estat *apo*.





**Figura 15.** Representació de les gràfiques de les distàncies entre Asp239-His267 i Tyr203-Asp97 de les simulacions de les tres rèpliques de l'enzim 4NZZ amb presència de l'enantiòmer R del NGE. A cada gràfica s'ha identificat a quina rèplica correspon.

Per altra banda, les simulacions realitzades amb mescla racèmica dels tres substrats (és a dir, dos enantiòmers R i dos S) la His267 es manté sempre en la conformació activa, excepte en una de les rèpliques pel substrat voluminós, R-NGE-S-NGE. Aquest fet indica que la proteïna es manté en la conformació catalíticament activa, tot i que el volum del centre actiu és inferior. Aquest fet es deu a que el temps d'interacció del substrat amb el centre actiu es redueix dràsticament respecte a les simulacions amb només un enantiòmer. Aquestes simulacions s'assemblen més a l'estat *apo*, indicant que la presència de substrat al voltant de l'enzim no provoca un canvi de conformació a la zona del centre actiu (Figura 16).



**Figura 16.** Representació de les gràfiques de les distàncies entre Asp239-His267 i Tyr203-Asp97 de les simulacions de les tres rèpliques de l'enzim 4NZZ amb presència de les tres mescles racèmiques. A la imatge s'ha marcat amb les lletres A (mescla del NGE), B (mescla del pNSO), C (mescla del PGE). A cada gràfica s'ha identificat a quina rèplica correspon.

En base a la bibliografia, el substrat s'espera que accedeixi al centre actiu a través de la regió 1. Tot i això, el substrat pot interaccionar amb altres regions de l'enzim com per exemple la regió 3 o el *lid*. Les simulacions de dinàmica molecular ens permeten estudiar el mecanisme d'entrada del substrat al centre actiu i així corroborar que l'entrada té lloc a través de la regió 1, però també permetrà revelar altres regions d'interacció que poden ser determinants per a la catàlisi. A l'analitzar les simulacions de dinàmica molecular, s'observa que la regió amb més afinitat correspon a la regió 1 (entrada per accedir al centre actiu). En totes les simulacions on el substrat ha accedit fins als residus catalítics l'entrada s'ha produït per aquesta regió. La segona regió a on es produeix més interacció correspon a la regió de sortida del producte. La interacció dels substrats amb aquesta regió 3 provoca l'obertura progressiva d'aquesta cavitat. Aquest últim comportament permet identificar la interacció que podria donar la inhibició per producte de l'enzim, dificultant-ne la sortida, ja que a les presents simulacions es comprova que el substrat presenta també afinitat per aquesta regió 3. Tot i l'elevada afinitat per aquesta regió, a través de les simulacions de dinàmica molecular convencional el substrat mai arriba a travessar el túnel per arribar al centre actiu. Per tal d'explorar si aquest fet és possible, es realitzen simulacions de dinàmica molecular accelerada (veure Metodologia) que han permès observar el pas de substrat de la regió 3 al centre actiu. En aquestes simulacions s'incrementa la flexibilitat de la proteïna tot i això pot generar moviments artificials a la proteïna que poden propiciar aquesta situació. Per tal de corroborar aquesta possible via d'entrada s'haurien d'estendre les simulacions de dinàmica molecular.

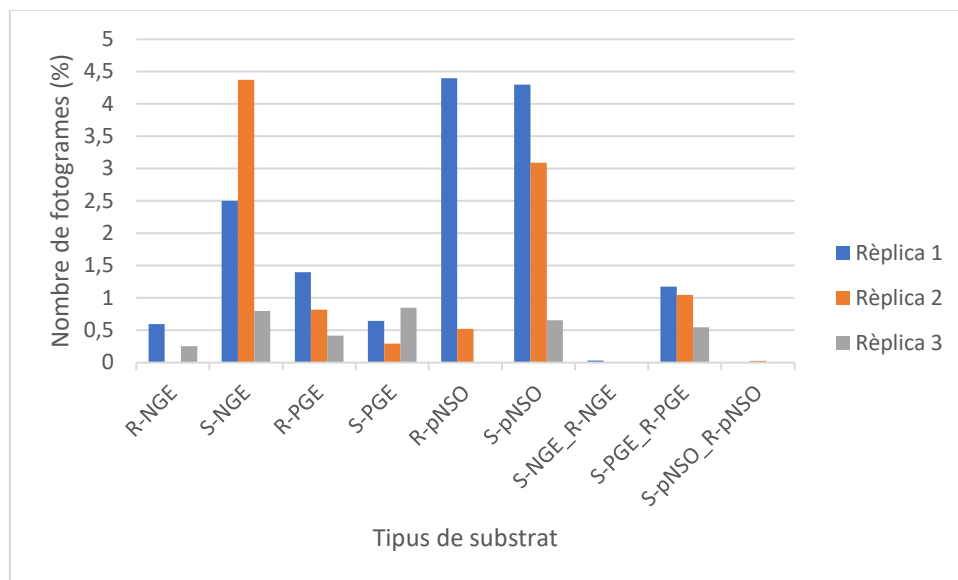
A més de la interacció amb les regions 1 i 3, s'han observat altres regions d'interacció amb la superfície de l'enzim. Tal i com s'observa a les simulacions, aquestes interaccions del substrat a la resta de regions disminueixen l'afinitat del substrat amb el centre actiu de l'enzim (efecte al·lostèric). Aquestes regions de la proteïna estan localitzades a la part superior del *lid* i a la part inferior del *loop* que conté l'Asp239. En una de les rèpliques de la simulació amb el substrat SP s'observa l'entrada d'aquesta molècula a una cavitat sota l'extrem dret del *lid*. Aquesta interacció amb la cavitat esmentada interfereix amb l'estabilitat del *lid*.

Un cop s'ha comprovat que en una simulació de dinàmica molecular de 200 ns és suficient per mostrar l'entrada de substrat per la regió 1, es passa a intentar quantificar el nombre de fotogrames en el qual el substrat es troba dins el centre actiu. Per explorar si el substrat es troba dins el centre actiu s'estableixen els següents criteris en base a distàncies entre el substrat i residus catalítics següents:

- a. Distància inferior a 6 Å del grup OH de la Tyr203 amb l'oxigen de l'epòxid.
- b. Distància inferior a 6 Å del grup OH de la Tyr144 amb l'oxigen de l'epòxid.
- c. Distància inferior a 6 Å d'un grup carbonil de l'Asp97 amb el carboni més substituït de l'epòxid.



S'ha escollit aquest límit de distància ja que es considera que a distàncies inferiors a 6 Å es pot donar reacció. Per aquest motiu es considera el substrat es troba dins el centre actiu quan es compleix que les tres distàncies definides tinguin valors per sota 6 Å. Els resultats obtinguts es recullen en la següent figura:

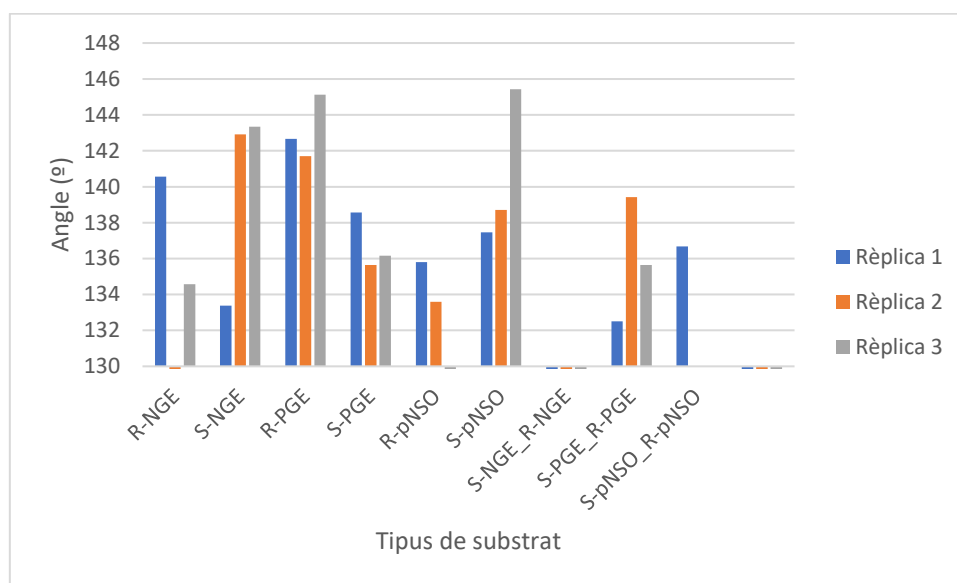


**Figura 17.** Representació del nombre de fotogrames (expressat en %) en el centre actiu per les tres rèpliques (indicat en blau, taronja i gris), respecte el tipus de substrat.

Tal i com s'observa a la Figura 17, totes les simulacions mostren que els substrats accedeixen a distàncies suficients per a que es doni la reacció. Això no implica que el substrat estigui correctament posicionat per a portar a terme la catàlisi, però sí que ha accedit al centre actiu. En el cas del substrat voluminós (precursor del propanolol), l'enantiòmer S és el que presenta un major temps de residència en el centre actiu. Aquest fet es podria interpretar com una major afinitat per l'enantiòmer S, i conseqüentment, com l'obertura d'aquest epòxid podria estar afavorida respecte la de l'enantiòmer R. Tot i això, una major afinitat no implica un correcte posicionament per a la catàlisi. A diferència del substrat voluminós, pel cas del PGE i pNSO, s'observen temps de residència similars per a tots dos enantiòmers. Al tractar-se de substrats menys voluminosos, no és estrany que tots dos enantiòmers puguin accedir fins el centre actiu, observant en totes les simulacions per aquests dos casos que les tres distàncies definides anteriorment mai són inferiors a 4 Å.

Un cop confirmada l'entrada del substrat es procedeix a identificar quines d'aquestes conformacions del substrat són catalíticament actives. Per aprofundir en aquest anàlisi i identificar conformacions actives del substrat es defineix un angle entre l'Asp97, el carboni més substituït del substrat i l'oxigen de l'epòxid. Segons la bibliografia, per a què es doni favorablement l'atac nucleòfil els valors d'aquest angle han de ser propers a 145 graus. Per dur a terme l'anàlisi, es considera que el substrat està ben posicionat si l'angle es troba entre 130 i

160 graus. A la Figura 18 es representa el valor mitjà de l'angle dels fotogrames que compleixen aquest últim requisit i es troben a distància inferior a 6 Å dels residus mencionats anteriorment. S'obté que la majoria de substrats assoleixen valors necessaris d'angle perquè es doni la reacció. En més detall, s'observa que l'enantiòmer S del precursor del propranolol (NGE) és el que presenta una millor orientació per afavorir el primer pas de la reacció, fet que coincideix amb el major temps de residència d'aquest enantiòmer. En el cas dels substrats menys voluminosos, PGE i NSO, tots dos enantiòmers presenten un temps de residència similar, on s'observa que l'enantiòmer R i l'enantiòmer S respectivament són els que s'orienten correctament per a portar a terme la catàlisi.



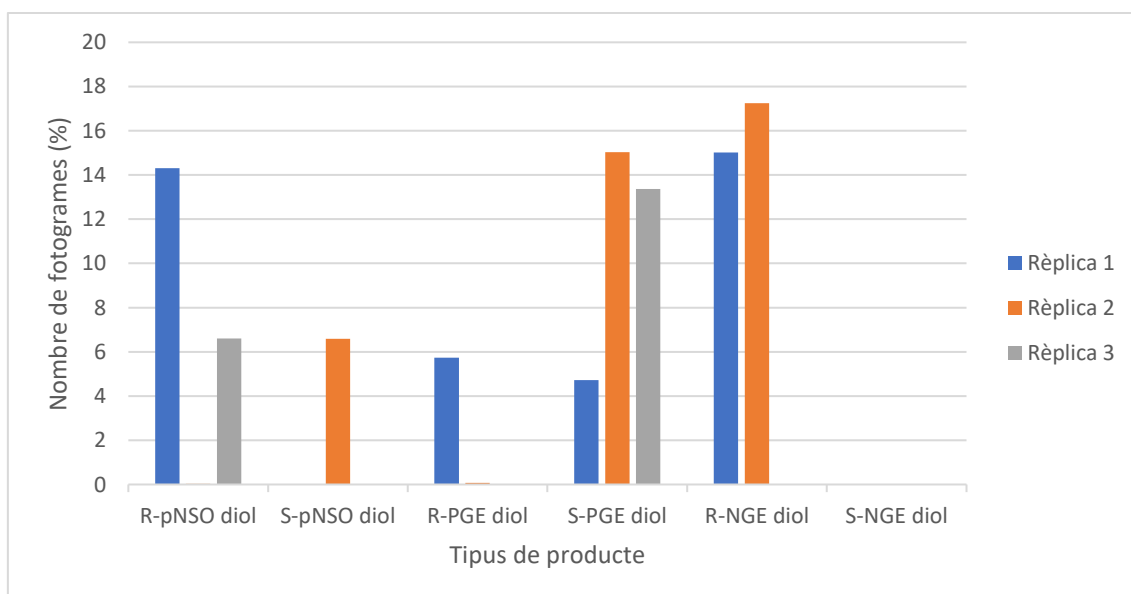
**Figura 18.** Representació del angles (expressat en °) en el centre actiu per les tres rèpliques (indicat en blau, taronja i gris), respecte el tipus de substrat.

### 4.3. Dinàmica Molecular de l'enzim en presència del Producte

Un cop s'ha observat l'entrada del substrat i que aquest es pot posicionar correctament per a la catàlisi es procedeix a estudiar quin efecte pot tenir la presència de producte a la dinàmica conformacional de l'enzim. Segons la bibliografia, el pas limitant de la reacció és l'alliberament del producte per a la regió 3 un cop realitzada la reacció dins el centre actiu. No només això, sinó que també hi pot haver inhibició competitiva de l'enzim per part d'aquest. Per aquest motiu, s'han realitzat simulacions de dinàmica molecular per tal d'analitzar el comportament de la proteïna amb presència del producte. D'aquesta manera, si aquest realment pot actuar com a inhibidor de l'enzim, s'espera obtenir un comportament que impedeixi l'entrada del substrat fins els residus catalítics. En els casos on s'observi la interacció del producte amb el centre actiu i el posicionament del producte cap el túnel, s'intentarà analitzar si és possible l'alliberament d'aquest per la regió 3.

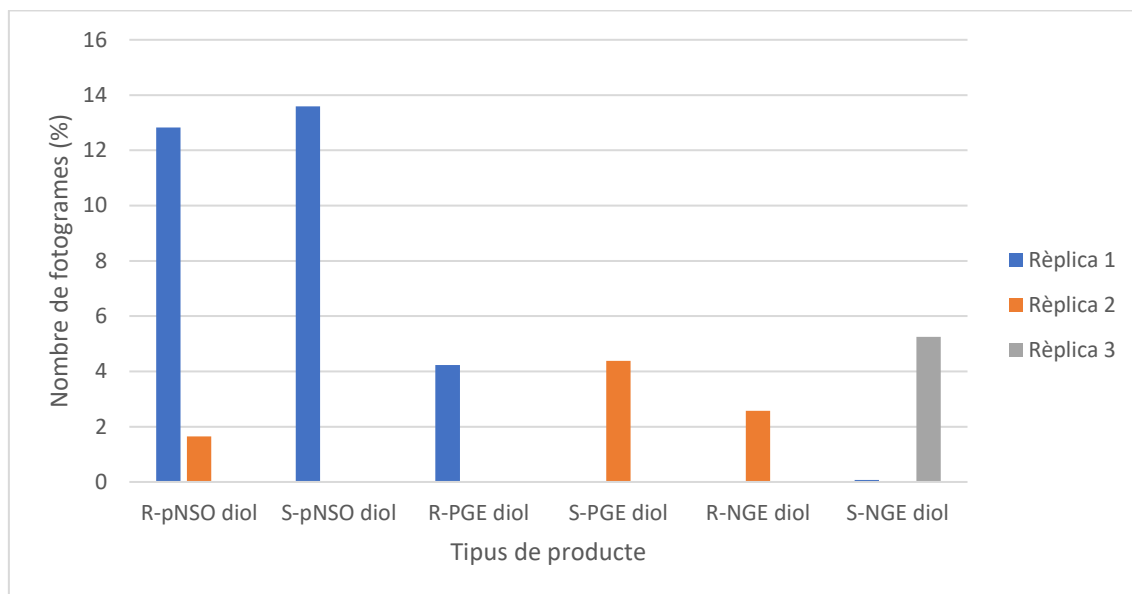
Per generar les dinàmiques moleculars amb el producte es segueix el mateix protocol que amb el substrat. Cal tenir en compte que, a diferència del substrat a on només hi ha un oxigen de l'epòxid, les estructures dels productes contenen dos grups hidroxil (diol). Aquest oxigen extra pot produir més interaccions amb la proteïna i, per tant, augmentar l'afinitat amb el centre actiu, fet que pot portar a la inhibició competitiva de l'enzim. Tal i com s'ha observat amb el substrat, no existeix una relació amb la presència de producte i el comportament dinàmic de la proteïna. De la mateixa manera que a la simulacions en estat *apo* i en presència de substrat, la His267 també presenta tres conformacions diferents en presència de producte. Tot i això, a diferència de les altres simulacions si que hi ha regions que si que presenten una major mobilitat a causa de la interacció amb el producte. Principalment la regió més afectada és la corresponent a la sortida del producte. Aquesta interacció produeix l'obertura d'aquesta regió, on es localitza la sortida del túnel i, per tant, també podria actuar com a inhibidor per la sortida d'aquest. Cal remarcar que el substrat també interaccionava amb aquesta última regió, per tant en una situació amb presència del producte i el substrat també podrien competir per la interacció d'aquesta regió.

Per tal de quantificar la interacció del producte amb la regió 3 es mesura la distància entre el producte i el sofre de la Met145 (veure Figura 19). Es considera que es produeix la interacció si aquesta distància és inferior a 6 Å. S'observa que el temps de residència al llarg de la simulació del producte NSO i NGE predomina la interacció de l'enantiòmer R, en canvi en el producte PGE és l'enantiòmer S. L'elevada afinitat per aquesta regió pot indicar que es pot produir inhibició no competitiva a través d'aquesta regió de l'enzim que bloquejaria la sortida del producte.



**Figura 19.** Representació del nombre de fotogrames (expressat en %) en la regió 3 per les tres rèpliques (indicat en blau, taronja i gris), respecte el tipus de substrat.

Tot i l'elevat grau d'interacció amb la regió 3, els diferents productes també mostren afinitat per a la regió 1 de l'enzim. En alguns casos, les interaccions que s'estableixen són fortes i el producte es queda al centre actiu durant el temps que resta de simulació.



**Figura 20.** Representació del nombre de fotogrames (expressat en %) en el centre actiu per les tres rèpliques (indicat en blau, taronja i gris), respecte el tipus de producte.

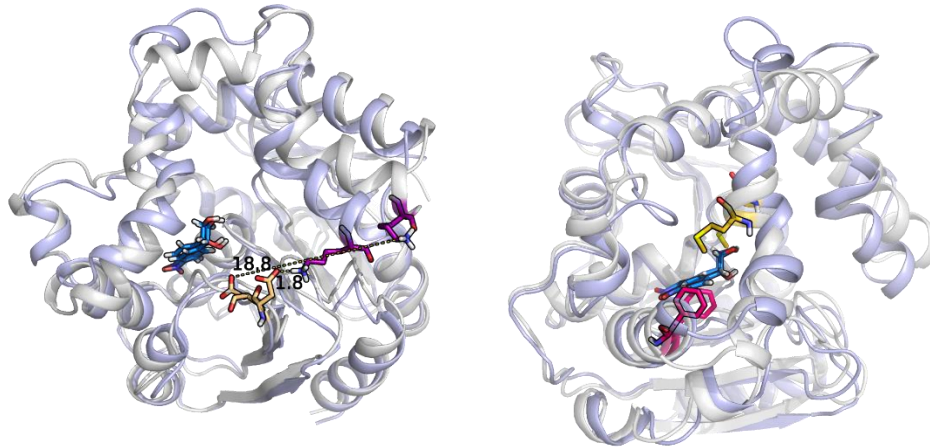
En totes les simulacions on el producte entra fins al centre actiu manté l'anell orientat cap a la superfície, establint interaccions polars entre els residus del centre actiu i els dos hidroxils que s'han originat de l'obertura de l'epòxid. Només en algunes de les simulacions amb presència de producte (rèplica 3 R-pNSO diol, rèplica 1 S-pNSO diol, rèplica 3 R-PGE diol i rèplica 3 R-NGE diol) s'observa la interacció dels dos hidroxils del producte amb el grup carboxilat de l'Asp97. Aquesta interacció, que es manté durant el temps restant de simulació pot indicar el mecanisme d'inhibició per producte de l'enzim.

Cal destacar la rèplica 1 del producte RSD on també s'observa l'entrada d'aquest al centre actiu i la potencial inhibició per producte establint interaccions amb l'Asp97. A diferència dels casos mencionats anteriorment, on l'anell s'orientava cap a la superfície de la proteïna, en aquest cas l'anell del producte s'orienta cap a la sortida del túnel que connecta la regió 1 amb la regió 3. Aquest fet es menciona a la bibliografia<sup>1</sup> on es postula que ha de ser l'orientació del producte per ser alliberat del centre actiu. Per tal de poder establir aquesta orientació i arribar a interaccionar amb la regió a on es produeix l'alliberament del producte, s'ha hagut de produir un canvi de conformació de la Tyr203. Aquest canvi de conformació porta la Tyr203 del centre actiu a col·locar-se entre els dos *backbones* que formen el *lid*. La fluctuació observada a la cadena lateral de la Tyr203 només s'ha visualitzat en aquesta simulació de totes les que s'han realitzat. Cal destacar que aquesta interacció no es produeix degut a l'entrada del producte, sinó que es tracta d'un canvi conformacional d'aquesta cadena lateral pròpia del

enzim en estat *apo*. El moviment d'aquest residu permet generar suficient volum per permetre al producte entrar al centre actiu i adoptar aquesta orientació cap al túnel de sortida. Aquest comportament permet suposar que el producte es pot orientar cap a aquesta posició de sortida, tot i que al llarg de la simulació no es trenca la interacció amb l'Asp97.

Utilitzant l'últim fotograma de la primera rèplica de la simulació del producte RSD com a punt de partida es comencen cinc simulacions de dinàmica molecular per comprovar si el producte es pot alliberar de les interaccions establertes amb el centre actiu. Aquestes cinc dinàmiques moleculars es desglossen en tres situacions diferents: a) dues rèpliques on només hi ha el producte que està inhibint l'enzim al centre actiu, b) dues on el producte està inhibint però també hi ha la presència de dos substrats del mateix enantiòmer (R-NSO) situats a l'entrada de la regió 1, i c) una on hi ha els quatre productes tal i com es trobaven a l'últim fotograma de la simulació R-pNSO diol amb dos substrats situats a les mateixes coordenades que en el cas anterior. En cap d'aquestes dinàmiques moleculars s'observa que el producte que es troba inhibint el centre actiu s'alliberi o canviï lleugerament de posició. La interacció amb els aminoàcids del centre actiu es manté constant en tots els casos. També s'observa que en totes les simulacions hi ha el tancament progressiu del *lid*. Tot i que en les simulacions que només hi ha el producte inhibint el centre actiu hi ha un tancament molt més marcat del *lid*. En les altres tres simulacions on hi ha presència de substrat, el *lid* no s'arriba a tancar completament a causa de que un substrat es posiciona a la part exterior del centre actiu, just al costat del *backbone* del *lid*, impedit que la Phe148 pugui orientar-se cap a l'interior del centre actiu ja que estableix interaccions *pi-stacking* amb el substrat.

Cal remarcar que el tancament del *lid* és tan marcat en les simulacions on només hi ha el producte inhibint el centre actiu que s'arriba a establir un pont saltí entre la Lys176, localitzada a l'extrem del *lid*, amb l'Asp239, estabilitzant d'aquesta manera la conformació tancada i promovent la inhibició de l'enzim (Figura 21, imatge esquerra). A la part final d'aquesta simulació s'observa la pèrdua de la conformació d'alfa helix de la part superior del *lid* causada pel canvi conformacional. Aquestes simulacions semblen indicar el caràcter inhibitori del producte provocant el tancament del *lid*. D'aquesta manera es confirmaria la inhibició per producte i l'impacte que pot tenir la presència d'aquest en la catàlisi enzimàtica. A més, el posicionament del producte cap a la regió d'alliberament d'aquest constata els resultats experimentals de Kong i col·laboradors on mutacions de la Phe128 i la Met145 porten a l'obtenció de més producte. Aquests dos residus estan localitzats a la regió del túnel i actuen com a comporta per permetre l'alliberament del producte (Figura 21, imatge dreta). Un altre tret característic que s'observa en les cinc simulacions és el trencament de la interacció entre la His267 i l'Asp239. De manera que el centre actiu no es troba en la conformació activa.



**Figura 21.** Representació a la dreta de la superposició de l'estructura inicial i final de la simulació 4NZZ en presència del producte R-p-NSO (*stick* color turquesa) on l'Asp239 (*sticks* color taronja) i la Lys176 (*sticks* color lila) formant un pont salí. Representació a l'esquerra de la superposició de l'estructura inicial i final de la simulació 4NZZ en presència del producte R-p-NSO (*stick* color turquesa) on el Met145 (*stick* color groc) i la Phe128 (*stick* color lila) tanquen la sortida del producte.

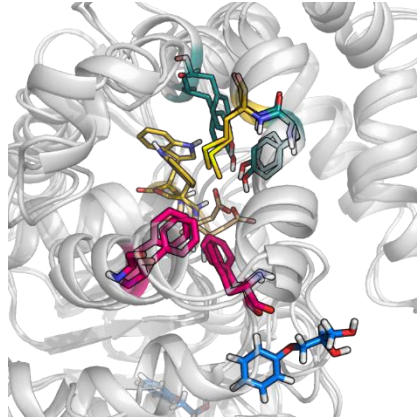
Tot i això, existeix la possibilitat que la simulació de 200 ns dinàmica molecular no sigui suficientment llarga per avaluar correctament el caràcter inhibitori del producte. Per aquest motiu es realitza una simulació de 200 ns de dinàmica molecular accelerada (aMD) a partir de l'últim punt de la dinàmica molecular convencional per tal de comprovar si es pot accelerar el procés d'alliberament del producte. En aquesta simulació de aMD, on hi ha presents els 4 productes, tampoc s'observa l'alliberació del producte del centre actiu, fet que remarca el clar caràcter inhibitori del producte. Durant la aMD, també s'observa l'entrada d'un producte a la regió 3, establint interacció amb Trp98, i un producte que entra per la regió 1, col·locant-se a la regió del centre actiu.

#### 4.4. Estudi del túnel de l'enzim

Tal i com s'ha mencionat en els apartats anteriors, l'obertura del túnel que permet connectar les regions 1 i 3 és una peça clau per poder explicar el que succeeix amb el producte un cop s'ha produït la reacció. Per aquest motiu en aquest apartat s'estudia en detall quins són els moviments locals que han de tenir lloc en els residus que permeten la seva formació. Els resultats es basen en les observacions extretes de les diferents simulacions de dinàmica molecular presentades anteriorment (estat *apo* i amb presència de substrat i/o producte).

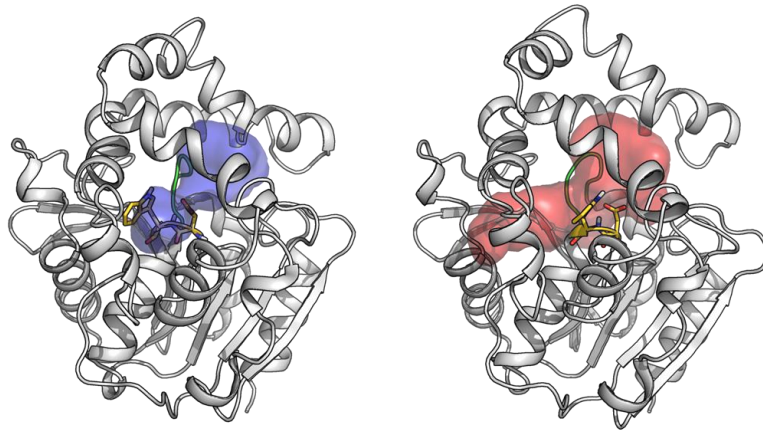
L'entrada al túnel està delimitada pels següents residus: a) tres dels aminoàcids catalítics (Asp97, Tyr203 i la Tyr144), b) la Phe242 que es localitza al *loop* de l'Asp239, i, per tant, directament lligat a la interacció d'aquest últim amb la His267, c) la Met145 localitzada al costat de la Tyr144 i, d) el Trp98 (Figura 22). Aquest últim residu actua com a comporta ja que en funció de la orientació de la cadena lateral pot obrir o tancar el túnel (veure apartat 4.2

Figura 14). També és rellevant destacar que quan els tres residus catalítics es troben correctament orientats per a la catàlisi el túnel es troba tancat. En canvi, una interacció que juga un paper clau per obrir l'entrada és el trencament del enllaç d'hidrogen entra la His267 i l'Asp239. El trencament d'aquesta interacció porta al desplaçament del *loop* que conté la Phe242 provocant l'obertura del túnel. Tots els canvis de conformació que s'observen indiquen que obrir el túnel és necessari que l'enzim estigui catalíticament inactiu.



**Figura 22.** Representació dels residus involucrat en la formació del túnel, R-pNSO (*stick* color turquesa), Met145 (*stick* color groc), Trp98 i Asp97 (*stick* color groc fosc), Try144 i Try203(*stick* color verd), Phe128 i Phe242 (*stick* color lila)

Un cop hi ha el suficient volum per permetre l'entrada del producte dins el túnel, en molts casos es generen dues sortides d'aquesta cavitat cap a l'exterior de l'enzim, una que passa per darrera el *loop* implicat en la sortida del producte i l'altra, la més freqüent, és la que implica la sortida per la regió 3. Tot i que en molts de casos s'observa de la mateixa manera la formació dels dos túnels, el que es postula com a més probable és el corresponent a la regió 3, ja que en les simulacions d'aMD s'observa l'entrada de substrats o productes des de la regió 3 fins al centre actiu. A més, a moltes simulacions s'observa la interacció de productes i substrats amb aquesta regió. Per tal que es produeixi la sortida a través del túnel també és necessària el canvi d'orientació de la Met145 i la Phe128, ja que el canvi d'orientació de les cadenes laterals d'aquests residus indueix l'obertura del túnel. Finalment, en alguns casos s'observa l'obertura d'un tercer túnel que passaria per darrera l'Asp97, tot i que es molt poc freqüent i també implica un canvi de conformació del Trp98 (Figura 23).



**Figura 23.** Representació del túnel que es produeix darrera el Asp97 (*stick* color groc fosc) i Trp98 (*stick* color groc fosc). On a la esquerra hi ha el volum en blau indicant el instant inicial i a la dreta hi ha el volum en vermell on es forma el túnel.

## 5. Conclusions

In this work, we analyzed the protein dynamics of the epoxide hydrolase enzyme from *Bacillus megaterium* (*BMEH*) by means of molecular dynamics simulations (MD) in three different states: apo, in the presence of the substrates, and in the presence of the products.

The main conclusions obtained from the apo simulation can be summarized as follows:

- The enzyme does not show significant global motions during the MD simulation, but the visual inspection of MD trajectories point out the importance of local motions. Therefore, the latter ones can be important for the catalytic activity.
- The analysis of the principal components (PCA) of the MD simulations has shown that the most flexible regions of the EH enzyme corresponds to the lid domain and to the loops where the catalytic residues are located.
- Most of the time of the MD simulations, the apo *BMEH* adopts a conformation in which the catalytic residues are properly oriented for the catalysis. However, the His267 can be found in three different conformations (catalytically competent, at an intermediate distance and catalytically incompetent).
- The local motions of the catalytic residues and those around the active site have been analyzed and seems to be crucial for the formation of the tunnel. These subtle motions can change drastically the volume inside the active site, thereby leading to conformations that have allowed to identify the presence of the tunnel that connects region 1 with 3.



*A priori*, we have not identified significant differences between the global motions observed in the apo state and those analyzed for the simulations in the presence of the substrate and/or the product.

The main conclusions obtained from the molecular dynamics simulation of the substrates and the products can be summarized as follows:

- The presence of the substrate around the enzyme has not induced a significant conformational change in the *BMEH* enzyme structure.
- The MD simulations have shown that all substrate can access the active site through the region 1 in less than 200 ns of simulations time without forcing the substrate to get into it.
- In most of the cases, the different substrates have oriented properly to favor the first stage of the catalytic reaction (nucleophilic attack). Furthermore, MD simulations have also given an idea of the enantioselectivity of the *BMEH*.
- In the presence of substrate racemic mixtures, the motion of the protein is leading most of the time to conformations in which the catalytic residues are well pre-organized to perform the reaction. Consequently, the volume in the active site is maintained constant along the MD simulation.
- The MD simulations in the presence of the product around the enzyme have not favored a significant conformational selection. The products interact most of the time with those residues located in the region 3. These findings can provide an initial idea of how the product inhibit the enzyme.
- For those cases that the product is located inside the active site, we have observed a strong interaction with the Asp97 that leads to a competitive inhibition of the *BMEH*.

The measurements of the volume in the active site and the careful analysis of the local motions of the *BMEH* along all MD simulations have allowed to identify the tunnel that connects the region 1 and 3. As a main conclusion, we have seen that this tunnel will exist when the Asp97, Tyr144, Tyr203, Asp239, His267 changes its conformation. Furthermore, the volume of the active site also increases when the side chains of Trp98, Phe128, Met145, Peh242 residues change the orientation.

## 6. Bibliografia

1. Kong X, Ma Q, Zhou J, Zeng B, Xu J. A Smart Library of Epoxide Hydrolase Variants and the Top Hits for Synthesis of (S)- $\beta$ -Blocker Precursors. *Angewandte Chemie*. 2014;126(26):6759-6762.
2. Orozco M. A theoretical view of protein dynamics. *Chemical Society Reviews*. 2014;43(14):5051.
3. Smit M, Labuschagne M. Diversity of Epoxide Hydrolase Biocatalysts. *Current Organic Chemistry*. 2006;10(10):1145-1161.
4. Morisseau C, Hammock B. Epoxide Hydrolases: Mechanisms, Inhibitor Designs, and Biological Roles. *ChemInform*. 2005;36(39).
5. Lee E, Shuler M. Molecular engineering of epoxide hydrolase and its application to asymmetric and enantioconvergent hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007;98(2):318-327.
6. Kotik M, Archelas A, Wohlgemuth R. Epoxide Hydrolases and their Application in Organic Synthesis. *Current Organic Chemistry*. 2012;16(4):451-482
7. Monterde M, Lombard M, Archelas A, Cronin A, Arand M, Furstoss R. Enzymatic transformations. Part 58: Enantioconvergent biohydrolysis of styrene oxide derivatives catalysed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2004;15(18):2801-2805.
8. Ollis D, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken S et al. The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*". 1992;5(3):197-211.
9. Armstrong R, Constance C. New structural and chemical insight into the catalytic mechanism of epoxide hydrolases. *Taylor & Francis*. 2017.
10. Amrein B, Bauer P, Duarte F, Janfalk Carlsson Å, Naworyta A, Mowbray S et al. Expanding the Catalytic Triad in Epoxide Hydrolases and Related Enzymes. *ACS Catalysis*. 2015;5(10):5702-5713.
11. Zhao J, Chu Y, Li A, Ju X, Kong X, Pan J et al. An Unusual (R)-Selective Epoxide Hydrolase with High Activity for Facile Preparation of Enantiopure Glycidyl Ethers. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2011;353(9):1510-1518.