

Pemodelan mekanisme reaksi enzimatik

Karya Tulis Ilmiah

Oleh:
Rustaman, M.Si



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PADJADJARAN
AGUSTUS 2008**

Pemodelan mekanisme reaksi enzimatik

Karya Tulis Ilmiah

Oleh:

Rustaman, M.Si

Mengetahui/Menyetujui:

Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unpad,

Dr. Unang Supratman, MS.
NIP. 131 929 830

Daftar Isi

Daftar Isi	i
Abstraks.....	1
1. Pendahuluan	1
2. Tujuan memodelkan reaksi enzimatik	3
3. Metode-metode untuk memodelkan reaksi enzimatis	5
4. Metode gabungan QM/MM.....	7
5. Membangun model untuk mensimulasikan reaksi enzimatik: tantangan dan kesulitan.....	9
6. Contoh-contoh aplikasi terkini.....	11
6.1. Sitokrom P450	11
6.2. Mekanisme resistensi antibiotik: Beta laktam kelas A	13
6.3. Prediksi pengaruh variasi genetik: glutathion-S-transferase.....	14
7. Kesimpulan	15
8. Daftar Pustaka	15

Pemodelan mekanisme reaksi enzimatik

Abstraks

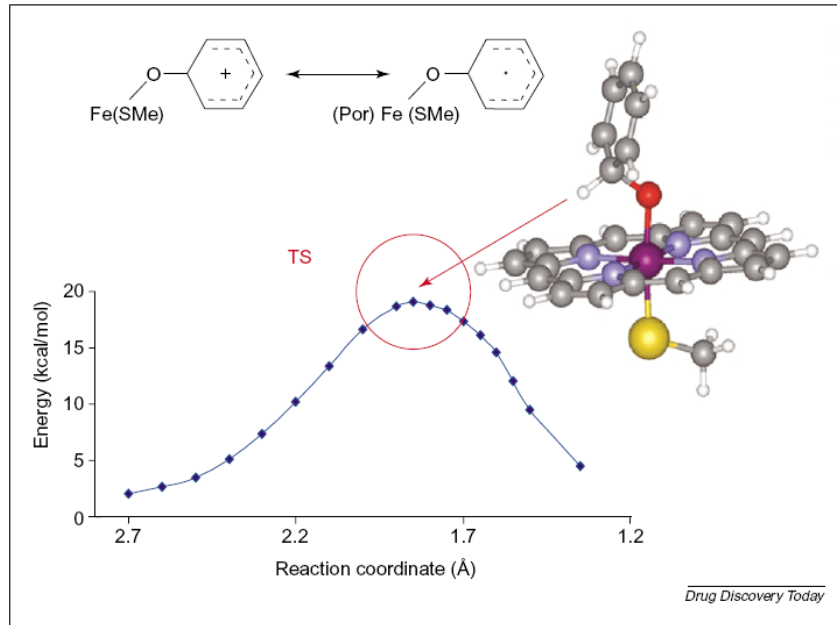
Saat ini metode pemodelan modern dapat memberikan pemahaman lengkap mengenai reaksi yang dikatalisis enzim, termasuk analisis mekanisme dan identifikasi bagian-bagian spesifik serta efisiensi katalisis. Bidang baru enzimologi komputasi telah muncul yang memiliki potensi secara signifikan dalam menyumbangkan pada perancangan berbasis struktur dan dalam mengembangkan model prediktif metabolisme obat, contohnya polimorfisme genetik. Ulasan ini menguraikan teknik-teknik penting dalam bidang ini termasuk studi pemodelan kimia kuantum dan metode gabungan mekanika kuantum dengan mekanika molekuler (QM/MM). Beberapa penerapan baru pada enzim secara farmakologi juga dibahas, yang memperlihatkan jenis-jenis masalah yang dapat ditangani dan sekilas informasi yang dapat diperoleh darinya.

Kata kunci: Pemodelan, Reaksi enzimatik, spesivitas, QM/MM.

1. Pendahuluan

Teknik-teknik yang dapat memodelkan reaksi enzimatik dan menganalisis determinan dari aktivitas enzim serta spesivitasnya memiliki potensi dalam menyumbangkan secara signifikan kepada perancangan dan pengembangan obat. Barangkali, keuntungan yang paling jelas adalah pada perancangan berdasarkan struktur, yang mana pemahaman mekanisme (contohnya dalam mengidentifikasi interaksi katalitik kunci pada bagian aktif dari enzim) akan membantu dalam merancang ligan secara rasional. Tidak begitu jelas tetapi kepentingannya meningkat adalah pemutusan obat (*drug breakdown*) atau pengaktifan oleh enzim [1], reaksi lawan yang dimediasi enzim [2] dan potensinya terhadap ketergantungan pada polimorfisme genetik, contohnya pada sitokrom P450 [2-4] (Gambar 1) dan glutathion S-transferase [5]. Saat ini metode pemodelan untuk mekanisme dapat menjawab pertanyaan-pertanyaan penting tentang reaksi yang dikatalisis enzim dan memberikan sumbangan praktis dan prediktif pada semua bidang ini.

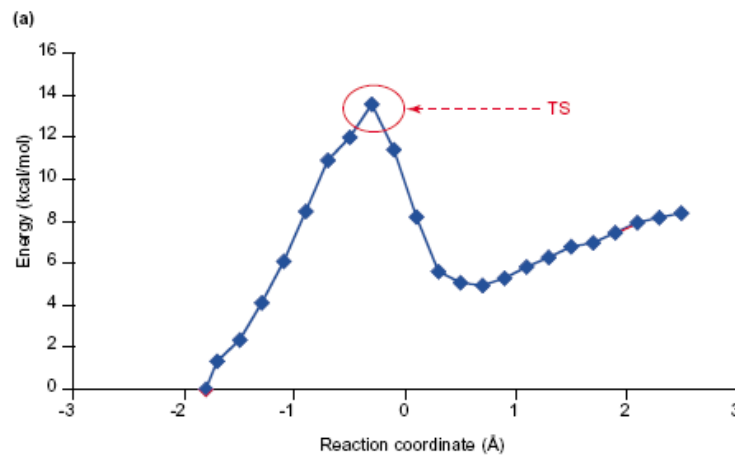
Dalam penemuan obat, awalnya enzim penting sebagai target (kebanyakan obat adalah inhibitor enzim) dan pada perancangan ligan akan menguntungkan dari sudut pandang pemahaman mekanismenya.



Gambar 1. Hidroksilasi aromatik pada Sitokrom P450, reaksi kunci pada metabolisme obat [5].

Sebagai contoh, pemodelan dapat memperlihatkan secara khas bagaimana keadaan transisi dan intermediet distabilkan oleh enzim yang seringkali memperlihatkan afinitas yang sangat tinggi untuk spesi yang tidak stabil ini, oleh karena itu membantu merancang inhibitor (Gambar 2). Pemodelan mekanisme menambah dimensi lain pada disain ligan berbasis struktur untuk target enzim. Analisis mekanisme biokim ini juga akan membantu mengembangkan model prediktif yang lebih baik (contohnya enzim-enzim kinase). Pemahaman yang lebih baik tentang sistem-sistem enzim yang terlibat juga diperlukan untuk prediksi yang dapat dipercaya tentang metabolisme farmasetikal dan sifat-sifat toksikologi (ADME-TOX). Pengembangan farmakognosi akan memerlukan model untuk memprediksi pengaruh variasi genetik pada aktivitas dan spesifisitas enzim. Hal yang terjadi pada pengembangan sistem-sistem biologi akan memerlukan pemahaman kualitatif dan prediktif yang lebih baik tentang peran enzim. Sebagai contoh, laju reaksi biokim yang tepat disyaratkan sebagai input untuk pemodelan jaringan sel dan

metabolit. Metode yang dapat dipercaya diperlukan untuk memprediksi pengaruh mutasi pada laju reaksi ini. Kebutuhan enzim untuk mengkatalisis proses pembuatan obat semakin meningkat dan ada kebutuhan yang jelas untuk memperluas lebih dari hanya aktifitas dan spesifisitas enzim yang terjadi secara alami untuk penggunaan biokatalitik, contohnya katalis protein yang didisain secara spesifik. Pada semua bidang ini, pemodelan molekul aktivitas enzim dapat memberikan kontribusi praktis yang penting.



Gambar 2. Kestabilan keadaan transisi pada reaksi enzim [5].

Bidang pemodelan komputer reaksi enzimatik sudah mapan sampai tingkat ini, sehingga saat ini cukup realistis dan masuk akal jika berbicara enzimologi komputasi [6-7]. Pemodelan komputer dan metode-metode simulasi dapat menjawab pertanyaan-pertanyaan dasar yang tidak mudah ditangani secara eksperimen biasa [8-10]. Pada tahun-tahun terakhir, sangat banyak jumlah penelitian dalam bidang pemodelan reaksi enzimatik dan suatu perubahan dalam kesempurnaan dan keandalannya. Selain mekanisme, pemodelan dapat menjawab pertanyaan-pertanyaan tentang spesifisitas, pengaruh mutasi atau variasi genetik dan derivatif dari SAR [11].

2. Tujuan memodelkan reaksi enzimatik

Dengan memulai dari data eksperimen, terutama informasi struktur sebagai titik awal, pemodelan dapat menjawab pertanyaan yang sulit dijawab secara eksperimen [12]. Tahap penting pertama untuk mempelajari reaksi

yang dikatalisis enzim adalah membangun mekanisme reaksinya. Ini berarti menentukan identitas-identitas residu katalis yang biasanya tidak jelas peranannya. Pemodelan dapat menganalisis keadaan transisi secara langsung; keadaan transisi adalah pusat pada reaksi katalisis dan tidak dapat dipelajari secara eksperimen karena waktu hidupnya sangat pendek. Interaksi spesifik lain yang juga mempengaruhi kestabilan keadaan transisi atau intermediet sebaiknya diidentifikasi. Interaksi ini mungkin tidak muncul dari struktur yang ditentukan secara eksperimen dan dapat menawarkan afinitas yang diperjelas jika mereka dieksploitasi pada ligan-ligan yang didisain, karena banyak enzim yang memperlihatkan afinitas yang sangat tinggi pada keadaan transisi dan intermediet. Perhitungan dapat menunjukkan dengan tepat secara katalitik gugus fungsi vital; beberapa contoh interaksi katalitik kunci teridentifikasi melalui perhitungan komputasi yang ada sekarang. Kebanyakan enzim memperlihatkan perubahan konformasi yang relatif besar selama siklus reaksinya, fungsi dan hubungan perubahan ini dengan tahap-tahap kimia sebaiknya dieksplorasi [13]. Protein memiliki dinamika yang kompleks, memperlihatkan rentang gerakan internal yang lebar, sebagian darinya adalah penting secara fungsional. Sudah banyak saran bahwa dinamika protein adalah penting dalam katalisis meskipun simulasi menunjukkan bahwa pengaruh langsung dinamika protein dalam menentukan laju reaksi kimia enzim secara umum relatif kecil [8,10,14]. Namun demikian, tentu saja penting untuk mempertimbangkan contoh yang representatif tentang konformasi yang mungkin dan pengaruh variasi konformasi pada reaksi enzim, sebagai contoh melalui simulasi dinamika molekul atau Monte Carlo. Pengaruh kuantum seperti penetrasi inti, adalah penting dalam banyak reaksi enzim yang melibatkan transfer hidrogen [15,16]. Terakhir, ketika peneliti tertarik pada pemahaman suatu enzim merupakan katalis yang efektif (yaitu kenapa reaksi yang dikatalisis lebih cepat daripada yang tidak dikatalisis) reaksi enzim harus dibandingkan dengan reaksi ekuivalen dalam larutan. Secara keseluruhan, pemahaman aktivitas enzim melibatkan tingkat-tingkat kerumitan yang berbeda-beda dan memberikan rentang tantangan yaitu perlu pendekatan

teoretis yang berbeda, tergantung pada pertanyaan yang ingin dijawab dalam masalah disain obat.

3. Metode-metode untuk memodelkan reaksi enzimatis

Tantangan utama dalam memodelkan reaksi enzimatis adalah ukuran ketipisan (*sheer size*) enzim. Metode mekanika molekul (MM) standard (contohnya medan gaya yang sudah dikenal, baik yang dikembangkan oleh AMBER, CHARMM, dan GROMOS) dapat menangani struktur dan dinamika protein, tetapi tidak dapat diterapkan pada reaksi kimia. Hal ini karena bentuk fungsinya yang sederhana (contohnya istilah harmonik untuk regangan ikatan) dan ketidakmampuan untuk memodelkan perubahan polarisasi elektron. Masih memungkinkan untuk mengembangkan parameter-parameter MM untuk reaksi tertentu, tetapi hal ini cukup menyita banyak tenaga dan parameter-parameter ini tidak dapat digunakan pada kasus lain. Dan bentuk-bentuk fungsi potensial dapat menentukan keterbatasan-keterbatasan perhitungannya (contohnya pengabaian polarisasi elektron). Penggambaran yang memperhitungkan mekanika kuantum dasar atau struktur elektron adalah lebih umum digunakan dan seringkali mudah diterapkan pada reaksi kimia. Metode kimia kuantum yang berdasarkan pada orbital molekul *ab initio* atau teori fungsi kerapatan saat ini dapat dipakai untuk mempelajari reaksi-reaksi dalam sistem molekul yang mengandung sepuluh atom. Model klaster kecil dengan ukuran tadi dapat memperlihatkan ciri-ciri utama reaksi enzimatis dan dapat mengidentifikasi mekanisme yang mungkin. Hal ini benar terutama untuk metaloenzim dimana semua tahap kimia utamanya berlangsung pada satu pusat logam dan logam tersebut mengikat ligan-ligannya disana yang dapat membatasi perlunya menentukan *artificial restrains* yang mempertahankan struktur enzim.

Perhitungan yang dapat dipercaya sudah memungkinkan dengan adanya perkembangan metode yang berdasarkan teori fungsi kerapatan. Fungsi-fungsi yang sudah banyak digunakan (contohnya fungsi hibrid B3LYP) memberikan hasil yang baik untuk kebanyakan reaksi dengan waktu perhitungan yang layak. Pekerjaan Siegbahn dkk., memberikan contoh bahwa perhitungan pada model kecil dapat memberikan tinjauan biokimia, seperti dalam

mengidentifikasi mekanisme enzim [17]. Contoh lain, Sitokrom P450, yang dibicarakan di bawah. Contoh gugus-gugus fungsi penting adalah rantai samping asam amino yang terlibat dalam katalisis atau binding, dan substrat yang posisi-posisinya diambil dari struktur kristal hasil sinar-x dari kompleks enzim. Oleh karena itu memungkinkan untuk mengoptimasi geometri kompleks yang mewakili reaktan, keadaan transisi, intermediet dan produk reaksi meskipun model kecil tidak mengandung semua gugus fungsi yang penting. Pengaruh lingkungan seperti solvasi dan interaksi elektrostatik-jauh dapat dimasukkan dengan cara pendekatan melalui model solvasi kontinum tetapi ini tidak secara lengkap mewakili lingkungan enzim yang heterogen [10]. Suatu pertimbangan praktis penting adalah bahwa akan sangat sulit untuk mengoptimasi geometri dari model (contohnya untuk mencari struktur keadaan transisi) ketika menjaga orientasi yang benar dari gugus-gugus fungsi dalam protein. Metode kimia kuantum yang lebih sederhana (contohnya teknik orbital molekul semiempirik AM1 dan PM3) dapat memodelkan sistem-sistem yang lebih besar (ratusan atom) tetapi seringkali tidak akurat dan dalam beberapa hal tidak mudah digunakan (untuk kebanyakan logam transisi)

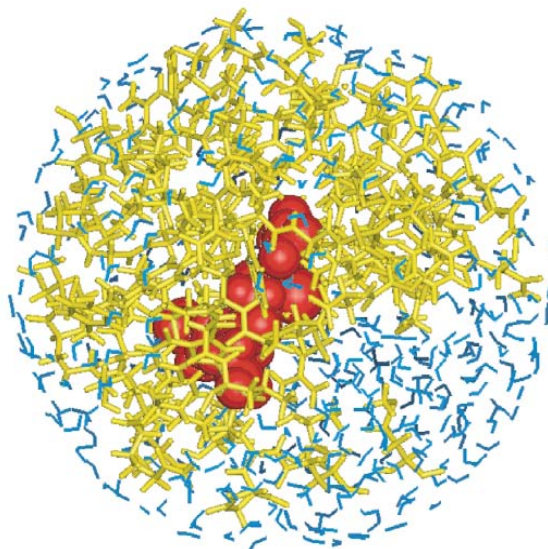
Hal yang sama penting dalam memodelkan suatu reaksi adalah menghitung lintasan reaksi dan pengambilan beberapa sampel konformasi yang merupakan tantangan yang cukup signifikan untuk molekul besar. Lingkungan enzim (biasanya larutan berair, tetapi beberapa enzim bekerja pada larutan pekat, dalam membran atau dalam protein atau juga dalam kompleks asam nukleat) harus diperhitungkan. Karena kompleksnya gerakan internal protein, banyak kemungkinan konformasi substrat dapat terjadi, sehingga struktur tunggal mungkin tidak terlalu mewakili [21]. Dalam pengambilan sampel untuk konformasi (contoh untuk menghitung profil energi bebas dan potensial gaya rata-rata [22]) metode simulasi harus mampu menghitung trajektori-trajektori pada rentang minimal dalam satuan pikodetik. Mungkin akan sangat berguna apabila menggunakan simulasi dinamika molekul MM yang dapat menjalankan simulasi yang relatif lama, yaitu selama nanodetik atau menggunakan struktur kristal neka-beda (*multiple different*)

untuk menghasilkan berbagai model untuk perhitungan mekanisme dan memastikan konformasi enzim yang mungkin.

Secara ideal, metode untuk mensimulasikan reaksi enzim harus dapat menangkap detail-detail yang penting dari reaksi kimia, termasuk enzim dan pelarutnya. Salah satu metode yang paling terkenal adalah model ikatan valensi empirik (EVB) [23], dimana struktur resonansi dipilih untuk mewakili reaksi dengan nilai energi setiap spesi yang ada diberikan dengan medan gaya empirik sederhana. Hamiltonian EVB dikalibrasi agar menghasilkan data yang sesuai dengan eksperimen untuk reaksi dalam larutan, atau cara lain adalah menggunakan hasil perhitungan *ab initio*. Energi bebas aktivasi untuk reaksi dalam larutan dan dengan enzim dapat dihitung menggunakan simulasi gangguan energi bebas.

4. Metode gabungan QM/MM

Metode gabungan QM/MM semakin populer dan *powerful* untuk memodelkan reaksi enzim. Metode ini menggabungkan penggambaran kimia kuantum dari gugus yang langsung terlibat dalam reaksi dengan perlakuan yang lebih sederhana mekanika molekuler untuk enzim dan lingkungannya (Gambar 3).



Gambar 3. Penerapan metode QM/MM pada pemodelan enzim [5].

Skema penggandengan yang berbeda dapat digunakan untuk menangani interaksi antara bagian QM dengan bagian MM. Enzim bersifat polar, sehingga penting untuk memasukkan polarisasi dari atom-atom QM dengan atom-atom tetangga MM-nya, seperti yang selalu dimasukkan dalam studi enzim secara QM/MM. Perhatian pada metode QM/MM telah berkembang pesat pada tahun-tahun terakhir dan sekarang menjadi jelas bahwa metode tersebut dapat memberikan tinjauan yang berguna secara biokimia terhadap mekanisme reaksi enzimatik [8-12]. Metode tersebut telah menunjukkan nilainya dalam mengidentifikasi fungsi-fungsi katalitik untuk residu-residu yang memiliki bagian aktif (seperti prolin yang kekal pada monooksigenase yang bergantung pada flavin [24]), dalam menjawab pertanyaan mekanistik dan menyarankan serta menguji prinsip-prinsip katalitik (seperti pengaruh konformasi dan kestabilan struktur keadaan transisi dalam enzim *chorismate mutase* [25,26,12]. Perdebatan yang begitu bersemangat saat ini pada asal mula katalisis dalam reaksi enzim sederhana menunjukkan bagaimana pemodelan dapat membantu untuk merumuskan dan menguji mekanisme dan hipotesis. Banyak macam implementasi metode QM/MM tersedia dalam banyak paket program yang sudah luas dikenal. Perhitungan QM/MM dapat dilakukan pada tingkat perhitungan struktur elektronik yang berbeda-beda, seperti *ab initio* [24,27,28], semiempirik [29,30], fungsional kerapatan [31] atau metode pendekatan fungsi kerapatan (contoh: *the self-consistent charge density-functional tightbinding (SCC-DFTB)*) [32] yang menggabungkan efisiensi komputasi dengan keakuratan yang sesuai untuk kebanyakan penggunaan. Struktur keadaan transisi dapat dioptimasi dan simulasi dinamika molekul dapat dilakukan dengan metode QM/MM yang lebih sederhana (seperti QM/MM semiempirik). Perbedaan energi bebas, seperti energi bebas aktivasi dapat dihitung, juga pengaruh kuantum seperti *tunneling* dan koreksi zpe [8,22]. Metode ini memiliki peran penting karena metode ini membolehkan simulasi yang lebih luas (contoh simulasi dinamik dan Monte Carlo, sampling konformasi dan perhitungan lintasan reaksi). Metode semiempirik yang sudah diparameterisasi secara spesifik keakuratan yang lebih baik untuk reaksi tertentu [5,9,22]. Perhitungan QM/MM tingkat tinggi

(contohnya QM dengan tingkat *ab initio* atau DFT) secara komputasi sangat dibutuhkan tetapi hanya untuk sistem-sistem tertentu dan untuk menguji metode yang lebih pendekatan.

5. Membangun model untuk mensimulasikan reaksi enzimatik: tantangan dan kesulitan

Dalam menerapkan metode QM/MM perlu kehati-hatian dan perhatian yang menyeluruh, contohnya dalam memilih sistem QM dan dalam mempartisi QM/MM [33]. Untuk sejumlah kecil enzim (contohnya enzim *chorismate mutase* [12,25,26,28]) tidak ada interaksi kovalen antara enzim dan substrat sehingga pemisahan ke dalam bagian QM dan MM dapat dilakukan langsung; interaksi QM/MM hanya akan memasukkan bagian MM untuk interaksi van Der Waals dan QM/MM untuk interaksi elektrostatik, meskipun dalam banyak hal, batas antara bagian QM dengan MM harus memisahkan atom-atom yang terikat secara kovalen. Beberapa metode telah dikembangkan agar memungkinkan pemisahan antara QM/MM ini, termasuk atom penghubung (*link atoms*), contoh atom hidrogen yang ditambahkan pada atom-atom batas QM [29,35], orbital hibrida yang digeneralisir [36,37] *pseudobonds* dan orbital terlokalisasi [30]. Metode ini telah secara luas diuji dan sudah ditemukan bahwa jika diterapkan dengan sesuai (contoh mempartisi ikatan-ikatan tunggal C-C jauh dari muatan kimia) kebanyakan dapat memberikan gambaran yang sesuai [33]. Sama pentingnya dengan metode mempartisi QM/MM adalah lokasi bidang batas, memperlakukan interaksi ikatan QM/MM (contoh semua term ikatan MM melibatkan minimal satu atom MM tetap (*retained*)) dan perlakuan interaksi elektrostatik qm/mm pada bidang batas (contohnya seringkali sebaiknya menghilangkan interaksi qm/mm dengan atom mm yang terikat secara kovalen). Pengaruh elektrostatik jarak-jauh mungkin signifikan dan perlu dimasukkan (contoh melalui model solvasi kontinum digabungkan dengan pemodelan QM/MM).

Sepintas lalu, faktor-faktor ini dapat membuat metode qm/mm nampak menakutkan. Penerapan metode QM/MM belum standar seperti metode perhitungan qm atau mm murni. Namun pekerjaan yang ekstensif telah menentukan prosedur dan pendekatan yang sudah ditunjukkan layak dan

menunjukkan menghasilkan prediksi yang baik. Dalam beberapa hal, memungkinkan untuk memvalidasi hasil perhitungan QM/MM tentang energi aktivasi melalui korelasi dengan konstanta laju reaksi hasil percobaan untuk reaksi enzim. Penting untuk diingat bahwa komplikasi yang dapat muncul pada pemodelan protein (qualitas dan kesesuaian struktur kristal, pengaruh ketidakteraturan, seperti konformasi alternatif atau residu yang hilang, mungkin keadaan protonasi dari gugus yang dapat diionisasi). Pada prakteknya, struktur kristal dengan resolusi tinggi dari kompleks enzim yang relevan (contoh substrat yang terikat atau keadaan transisi analognya) diperlukan untuk pemodelan mekanisme yang layak [33]. Resolusi struktur kristal adalah suatu indikasi dari ketepatan struktur tetapi ini bukan satu-satunya faktor yang harus dipertimbangkan: kompleks harus mewakili kompleks reaktif dan contohnya bukan untuk konformasi yang tidak reaktif pada kondisi pH dan konsentrasi terlarut yang terkait dengan lingkungan dimana enzim yang sebenarnya berfungsi. Struktur kristal mewakili rata-rata semua molekul dalam kristal dan semua waktu selama eksperimen kristalografi; perata-rataan ini kadang-kadang berlaku untuk rantai samping asam amino. Struktur kristal protein sebaiknya tidak dipandang sebagai struktur molekul tunggal sederhana. Seperti simulasi diomolekul lainnya, struktur awal sebaiknya diperiksa secara hati-hati pada tahap-tahap awal terhadap potensinya dalam kesulitan nantinya atau ketidakpastiannya. Saran para ahli biologi struktur dapat membantu mengidentifikasi dan menghilangkan masalah-masalah yang potensial.

Ketika memulai mensimulasikan mekanisme reaksi enzimatik, sangat penting untuk memilih keadaan-keadaan terprotonasi dari gugus-gugus fungsi dengan benar. Nilai-nilai pKa untuk rantai samping asam-asam amino yang bersifat asam maupun basa pada enzim dapat sangat berbeda secara signifikan dari nilai yang diharapkan dalam keadaan larutan. Memilih keadaan terprotonasi berdasarkan nilai pKa standar mungkin dapat memberikan model yang salah, kasus yang terburuk dapat mengarah pada mekanisme yang salah yang dimodelkan. Mungkin suatu ide yang baik untuk menggunakan metode

dari harga pKa hasil perhitungan terutama untuk residu bagian-aktif (active-site).

Penerapan secara hati-hati, perhitungan QM/MM dapat memberikan pengetahuan yang unik mengenai mekanisme enzim dan spesifitas. Metode QM/MM juga menjadi semakin penting dalam mempelajari binding ligan, yang mana metode ini menawarkan beberapa keuntungan dibandingkan metode MM, termasuk gambaran fisik yang lebih baik tentang ligan (contohnya tentang polarisasinya) dan menghindari kebutuhan akan parameterisasi yang cukup menyita waktu. Bidang ini masih berkembang dan belum sampai pada tahap dimana prediksi kuantitatif dan eksak, contoh laju reaksi dapat secara rutin dibuat. Untuk alasan ini, penting untuk memvalidasi hasil prediksi yang dihasilkan dari pemodelan dengan data eksperimen: prediksi nilai pKa gugus-gugus fungsi dalam protein ini memberikan suatu contoh jenis pengujian yang berguna dan akurat. Perkembangan terkini meliputi penggunaan metode QM/MM untuk simulasi gangguan energi-bebas [34], contohnya untuk menghitung binding affinity relatif dan pada molecular docking [39]. Metode QM/MM pasti akan menjadi lebih penting dalam aplikasi perancangan obat praktis.

6. Contoh-contoh aplikasi terkini

Keputusan kunci pada pemodelan reaksi enzim adalah pemilihan metode yang sesuai untuk menjawab pertanyaan-pertanyaan yang diajukan secara praktis yang mana hasilnya dapat dipercaya dalam waktu yang layak. Kemampuan metode-metode terkini akan lebih mudah dipahami dengan memberikan contoh-contoh aplikasi enzim pada bidang farmakologi.

6.1. Sitokrom P450

Penelitian terkini tentang hidrosilasi aromatik oleh sitokrom P450 memperlihatkan bagaimana perhitungan kimia kuantum pada model-model kecil dapat membantu dalam mengembangkan hubungan struktur dengan reaktivitas. Sitokrom P450 mengkatalisis berbagai reaksi oksidasi pada banyak proses vital, seperti dalam karsinogenesis dan metabolisme obat [40]. Reaksi yang cukup penting dalam mekanisme obat [41] adalah

hidroksilasi ikatan-ikatan C–H. Jenis reaksi ini dapat mengaktivasi prodrug atau mempengaruhi bioavailability sediaan farmasi. Untuk prediksi ADME-TOX, tujuannya adalah untuk mengembangkan SAR untuk memprediksikan konversi obat [1]. Pendekatan yang hanya berdasarkan struktur dan sifat zat telah terbukti penggunaannya terbatas. Model-model yang lebih lengkap diperlukan dalam memperhitungkan mekanisme reaksi dan spesifisitas isozim sitokrom P450 yang berbeda. P450 memiliki siklus reaksi yang rumit, dengan beberapa tahap, dimana setiap tahap dapat merupakan pembatas laju reaksi bergantung pada substrat dan enzim yang digunakan. Oksidasi tidak selalu merupakan tahap pembatas laju, tetapi untuk memahami regioselektivitas dan memprediksi rasio produk-produk alternatif dari substrat yang diberikan, contoh hubungan struktur-reaktivitas untuk oksidasi mungkin berguna.

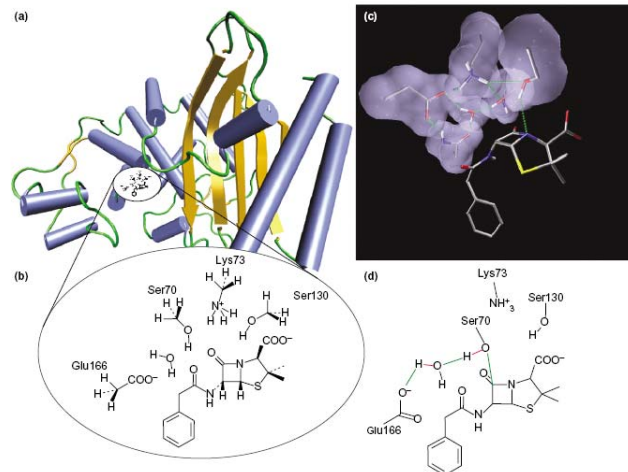
Bethel et al. [3,4], telah mempelajari reaksi-reaksi senyawa aromatik sederhana dengan senyawa I [suatu haem kation radikal porfirin oksobesi (IV), yang mungkin merupakan suatu spesi aktif pada oksidasi] dalam suatu model yang terdiri atas porfirin tanpa rantai samping dan besi yang dikoordinasi oleh gugus metil merkaptida (MeS^- , mewakili sisteinat) (Gambar 1). Metode DFT hibrid B3LYP yang digunakan dapat memprediksi struktur dan energi dengan akurat untuk sistem bioanorganik seperti P450 senyawa I dan kompleks-kompleks logam transisi lainnya. Ditemukan dua rute reaksi yang berbeda, berbeda dalam hal orientasi cincin benzen ketika mendekati senyawa I (dari sisi dan dari muka, yang kedua memiliki rintangan energi yang lebih kecil). Orientasi dari keduanya penting bergantung pada obat yang digunakan. Keadaan transisi ditemukan memiliki karakter campuran antara radikal dan kation dan pandangan ini mengarah ke perkembangan baru tentang hubungan antara struktur dan reaktivitas (SAR untuk memprediksi seberapa kecil molekul akan bereaksi dan ditransformasikan oleh enzim tertentu pada metabolisme) untuk benzen-benzen tersubstitusi, menggunakan pendekatan dua parameter yang menggabungkan deskriptor elektronik kation dan radikal.

Sifat reaktif dari gugus haem dan senyawa I, pada hakekatnya sama untuk semua CYP450. Akan tetapi spesifisitas dan posisi hidroksilasi sangat berbeda antara isoenzim-isoenzim P450 yang berbeda dan dapat didominasi oleh pengaruh orientasi dan afinitas pada daerah binding atau oleh reaktivitas kimia dari posisi substrat yang berbeda. Polimorfisme genetik juga dapat menjadi penting, contohnya dalam metabolisme obat [2]. Reaktivitas P450 juga dapat dipengaruhi oleh modulasi sifat elektronik dari senyawa I oleh lingkungan protein. Untuk menjawab pertanyaan tentang spesifisitas seperti ini, model-model yang melibatkan protein-protein perlu diperhatikan. Tahap-tahap penting dalam arah ini telah dipelajari menggunakan metode QM/MM pada bakteri P450 yang telah memunculkan isu reaktifitas yang kontroversial [43,44]. Dengan penyelesaian terkini dari struktur kristal P450 dari manusia, studi QM/MM tentang enzim yang secara langsung terkait dengan metabolisme obat sekarang dimungkinkan.

6.2. Mekanisme resistensi antibiotik: Beta laktam kelas A

Metode QM/MM saat ini telah digunakan untuk memodelkan mekanisme pemecahan antibiotik pada salah satu kelas yang paling penting dari enzim resisten dari bakteri, beta laktamase kelas A [46]. Asilasi *Escherichia coli* TEM1 laktamase dengan benzilpenicilin saat ini telah dimodelkan menggunakan metode QM/MM (Gambar 4). Bagian QM (70 atom) meliputi semua residu sisi-aktif yang secara langsung terlibat dalam reaksi dan substrat. Struktur dan interaksi-interaksi dengan protein dimodelkan dengan pendekatan QM/MM (AM1/CHARMM22), karena tingginya biaya komputasi apabila memodelkan menggunakan tingkat yang lebih tinggi. Sedangkan perhitungan energi reaksi pada tingkat yang lebih baik (M3LYP/6-31+G(d)) dikoreksi untuk keterbatasan metode semiempirik AM1. Permukaan energi potensial dihitung menggunakan minimisasi energi QM/MM, menggunakan koordinat reaksi yang sudah ditentukan untuk menguji mekanisme yang mungkin. Hasilnya menunjukkan bahwa Glu166 sebagai basa umum, mendeptonasi molekul

air yang nantinya akan mengaktivasi Ser70 untuk serangan nukleofilik pada antibiotik. Setelah itu, terbentuk asilenzim dengan Ser130 sebagai donor proton terhadap cincin tiazolidin dari antibiotik, dengan Lys73 proton shuttle. Mekanisme ini konsisten dengan data struktur dan kinetika secara eksperimen.



Gambar 4. Pemodelan pemecahan antibiotik oleh β -laktamase kelas A

Contohnya, halangan energi QM/MM hasil perhitungan (9 kkal/mol) konsisten dengan energi aktivasi hasil eksperimen (12 kkal/mol). Interaksi-interaksi penting juga teridentifikasi yang dapat membantu dalam mengembangkan antibiotik beta-laktam yang stabil dan dalam merancang inhibitor laktamase baru.

6.3. Prediksi pengaruh variasi genetik: glutathion-S-transferase

Simulasi dinamika molekul QM/MM telah digunakan untuk memodelkan konjugasi glutathion pada fenantren-9,10-oksida dalam glutathion-S-transferase (GST), yang menunjukkan dengan tepat suatu penentu stereospesivitas pada pembukaan cincin epoksida [5]. Perbedaan satu asam amino, tidak jelas dari struktur atau data sequen, teridentifikasi penting dalam menentukan stereospesivitas isozim GST untuk reaksi ini. Parameter-parameter hasil optimasi AM1 digunakan untuk nukleofil sulfur. Simulasi dinamika molekul pada *umbrella-sampling* (mengggunakan

program CHARMM dan parameter protein CHARMM22) digunakan untuk menghitung profil energi bebas reaksi, menggunakan koordinat reaksi pendekatan (perbedaan jarak antara $S_{\text{tiolat}}-C_{\text{epoksida}}$ dan $C_{\text{epoksida}}-O_{\text{epoksida}}$). Hasil perhitungan energi aktivasinya sangat sesuai dengan data eksperimen. Perbedaan antar isozim-isozim GST dianalisis dengan menghitung pengaruh mutasi pada tinggi energi penghalang dan energi reaksi pada pembentukan dua produk diastereomer yang mungkin, yang menggambarkan potensi pemodelan QM/MM untuk memahami dan memprediksi akibat fenotif dari variasi genetik.

7. Kesimpulan

Keberadaan metode-metode baru yang powerful menjadikan pemodelan dan simulasi menjadi suatu cara yang unggul dalam meneliti aktivitas enzim, spesifisitas dan katalisis. Dengan kompleksitas enzim, pengujian akan selalu dilakukan dengan cara yang lebih hati-hati dan menyeluruh. Kemudian teknik-teknik ini akan memberikan hasil analisis yang khas dan sangat praktis pada masalah enzimologi dalam penemuan obat, dan kontribusinya akan meningkat pada masa yang akan datang.

8. Daftar Pustaka

1. Ridder, L. and Mulholland, A.J. (2003) Modeling biotransformation reactions by combined quantum mechanical/molecular mechanical approaches: From structure to activity. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 1241–1256.
2. Pirmohamed, M. and Park, B.K. (2003) Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions. *Toxicology* 192, 23–32.
3. Bathelt, C.M. et al. (2003) Aromatic hydroxylation by cytochrome P450: model calculations of mechanism and substituent effects. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 15004–15005.
4. Bathelt, C.M. et al. (2004) Mechanism and structure–reactivity relationships for aromatic hydroxylation by cytochrome P450. *Org. Biomol. Chem.* 2, 2998–3005.

5. Ridder, L. et al. (2002) Quantum mechanical/molecular mechanical free energy simulations of the glutathione S-transferase (M1-1) reaction with phenanthrene 9,10-oxide 124. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9926–9936.
6. Cunningham, M.A. and Bash, P.A. (1997) Computational enzymology. *Biochimie* 79, 687–689.
7. Bruice, T.C. and Kahn, K. (2000) Computational enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 540–544.
8. Garcia-Viloca, M. et al. (2004) How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations. *Science* 303, 186–195.
9. Field, M.J. (2002) Simulating enzyme reactions: challenges and perspectives. *J. Comput. Chem.* 23, 48–58.
10. Shurki, A. and Warshel, A. (2003) Structure/function correlations of proteins using MM, QM/MM, and related approaches: methods, concepts, pitfalls, and current progress. *Adv. Protein Chem.* 66, 249–313.
11. Perruccio, F. et al. (2003) Quantum-mechanical/molecular-mechanical methods in medicinal chemistry. In *Quantum Medicinal Chemistry* (Carloni, P. and Alber, F. eds), pp. 177–198.
12. Marti, S. et al. (2004) Theoretical insights in enzyme catalysis. *Chem. Soc. Rev.* 33, 98–107.
13. Karplus, M. et al. (2005) Protein structural transitions and their functional role. *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.* 363, 331–355.
14. Olsson, M.H.M. and Warshel, A. (2004) Solute solvent dynamics and energetics in enzyme catalysis: The SN₂ reaction of dehalogenase as a general benchmark. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 15167–15179.
15. Kohen, A. et al. (1999) Enzyme dynamics and hydrogen tunnelling in a thermophilic alcohol dehydrogenase. *Nature* 399, 496–499.
16. Masgrau, L. et al. (2004) Hydrogen tunneling in quinoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 428, 41–51.
17. Himo, F. and Siegbahn, P.E.M. (2003) Quantum chemical studies of radical-containing enzymes. *Chem. Rev.* 103, 2421–2456.
18. Van der Vaart, A. et al. (2000) Linear scaling molecular orbital calculations of biological systems using the semiempirical divide and conquer method. *J. Comp. Chem.* 21, 1494–1504.

19. Khandogin, J. and York, D.M. (2004) Quantum descriptors for biological macromolecules from linear-scaling electronic structure methods. *Proteins* 56, 724–737.
20. Khandogin, J. et al. (2003) Insights into the regioselectivity and RNA-binding affinity of HIV-1 nucleocapsid protein from linear-scaling quantum methods. *J. Mol. Biol.* 330, 993–1004.
21. Zhang, Y.K. et al. (2003) Influence of structural fluctuation on enzyme reaction energy barriers in combined quantum mechanical/molecular mechanical studies. *J. Phys. Chem. B* 107, 4459–4463.
22. Gao, J. and Truhlar, D.G. (2002) Quantum mechanical methods for enzyme kinetics. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 53, 467–505.
23. Warshel, A. (2003) Computer simulations of enzyme catalysis: methods, progress, and insights. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32, 425–443.
24. Ridder, L. et al. (2003) Ab initio QM/MM modeling of the hydroxylation step in p-hydroxybenzoate hydroxylase. *J. Phys. Chem. B* 107, 2118–2126.
25. Ranaghan, K.E. and Mulholland, A.J. (2004) Conformational effects in enzyme catalysis: QM/MM free energy calculation of the ‘NAC’ contribution in chorismate mutase. *Chem. Commun. (Camb)* 1238–1239.
26. Ranaghan, K.E. et al. (2004) Transition state stabilization and substrate strain in enzyme catalysis: ab initio QM/MM modelling of the chorismate mutase reaction. *Org. Biomol. Chem.* 2, 968–980.
27. Mulholland, A.J. et al. (2000) Ab initio QM/MM study of the citrate synthase mechanism. A low-barrier hydrogen bond is not involved. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 534–535.
28. Woodcock, H.L. et al. (2003) Exploring the quantum mechanical/molecular mechanical replica path method: a pathway optimization of the chorismate to prephenate Claisen rearrangement catalyzed by chorismate mutase. *Theor. Chem. Acc.* 109, 140–148.
29. Field, M.J. et al. (1990) Combined quantum mechanical and molecular mechanical potentials for molecular dynamics simulations. *J. Comp. Chem.* 11, 700–733.
30. Warshel, A. and Levitt, M. (1976) Theoretical studies of enzymic reactions – dielectric, electrostatic and steric stabilization of carbonium ion in reaction of lysozyme. *J. Mol. Biol.* 103, 227–249.

31. Lyne, P.D. et al. (1999) A hybrid QM-MM potential employing Hartree-Fock or density functional methods in the quantum region. *J. Phys. Chem. A* 103, 3462–3471.
32. Cui, Q. et al. (2001) A QM/MM implementation of the self-consistent charge density functional tight binding (SCC-DFTB) method. *J. Phys. Chem. B* 105, 569–585.
33. Mulholland, A.J. (2001) The QM/MM Approach to Enzymatic Reactions. In *Theoretical Biochemistry* (Eriksson, L.A. ed.), pp. 597–653, Elsevier
34. Riccardi, D. et al. (2004) Importance of van der Waals interactions in QM/MM Simulations. *J. Phys. Chem. B* 108, 6467–6478.
35. Das, D. et al. (2002) Optimization of quantummechanical molecular mechanical partitioning schemes: Gaussian delocalization of molecular mechanical charges and the double link atom method. *J. Chem. Phys.* 117, 10534–10547.
36. Pu, J.Z. et al. (2004) Combining self-consistent charge density-functional tight-binding (SCC-DFTB) with molecular mechanics by the generalized hybrid orbital (GHO) method. *J. Phys. Chem. A* 108, 5454–5463.
37. Pu, J.Z. et al. (2004) Generalized hybrid orbital (GHO) method for combining ab initio Hartree Fock wave functions with molecular mechanics. *J. Phys. Chem. A* 108, 632–650.
38. Ridder, L. et al. (2000) A quantum mechanical/molecular mechanical study of the hydroxylation of phenol and hydroxylated derivatives by phenol hydroxylase. *J. Am. Chem Soc.* 122, 8728–8738.
39. Raha, K. and Merz, K.M. (2004) A quantum mechanics-based scoring function: study of zinc ion-mediated ligand binding. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 1020–1021.
40. Meunier, B. et al. (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* 104, 3947–3980.
41. Guengerich, F.P. (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Rev. Toxicol.* 14, 611–650.