

[1] Departament de Química Inorgànica i Orgànica i Institut de Química Teòrica i Computacional (IQTCUB), Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1, 08028 Barcelona.
[2] Laboratori de Bioquímica, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, Via Augusta, 390, 08017 Barcelona.
[3] Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Passeig Luíís Companys, 23, 08018 Barcelona.

Introducció

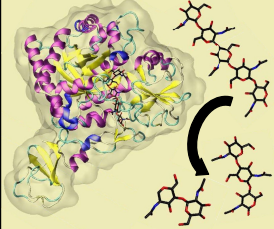


Figura 1. Estructura cristal·logràfica de la quitinasa B de *Serratia marcescens* (SmChIB, codi PDB: 1E6Z^[1]). Representació de la hidròlisi d'una cadena de quitina.

Figura 2. Exemples de fonts naturals de quitina. Cranc fantasma (*Oktyope ceratophthalma*) i escamarlans (*Nephtys norvegicus*).

Les **glicosil hidrolases** (GH) són enzims responsables de la hidròlisi de l'enllaç glicosídic que uneix dues unitats de carbohidrat. Un factor clau en la catàlisi és la conformació del sucre o carbohidrat, que es pot descriure mitjançant les coordenades d'empaquetament de **Cremer-Pople**^[1].

Concretament, les **quitinases**^[2] (Figura 1) trenquen els enllaços glicosídics de la **quitina**, un polisacàrid format per unitats de N-acetilglucosamina (NAG). La quitina es troba a la paret cel·lular de fongs o a l'exoesquelet d'insectes i crustacis (Figura 2), i s'utilitza en una àmplia gama d'aplicacions biotecnològiques^[3].

Encara que s'ha proposat un mecanisme de reacció per les quitinases (Figura 3),^[4,5,6] hi ha controvèrsia respecte la conformació que adopta el carbohidrat durant la catàlisi enzimàtica, en particular a l'intermedi de reacció (conformació cadira ⁴C₁ o barca B_{3,0}), així com l'estat de protonació d'aquest intermedi: molècula d'oxazolina (sense protonar) o ió oxazolini (protonat).

En aquest treball s'ha estudiat la conformació de l'intermedi de reacció en fase gas per conèixer les propietats intrínseques del carbohidrat (tot contemplant els dos possible estats de protonació) i també a l'interior de l'enzim quitinasa B de *Serratia marcescens* (SmChIB)^[5] per analitzar l'efecte que produeix l'entorn proteic.

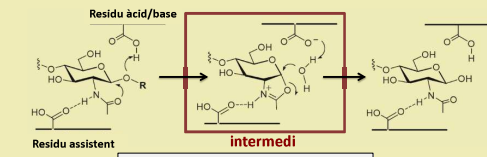
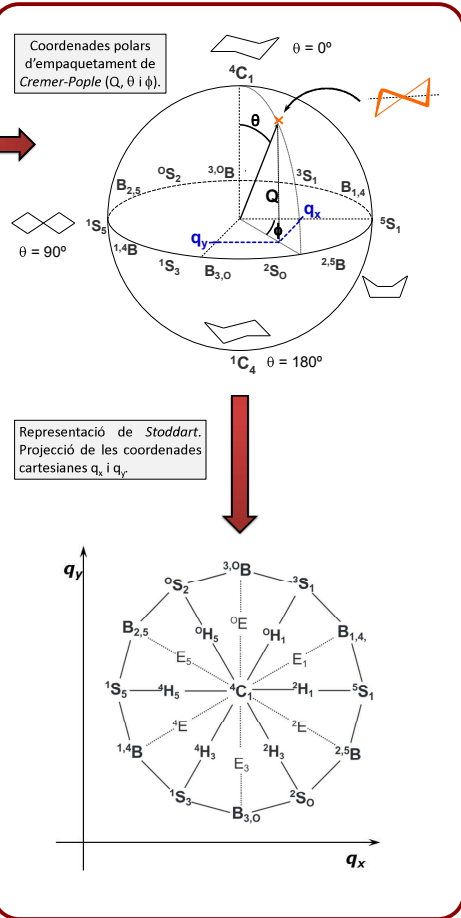


Figura 3. Esquema de la reacció de quitinases.



Mètodes

Càlcul en fase gas: oxazolina i ió oxazolini

Dinàmica molecular de primers principis (Car-Parrinello)^[6]:

- DFT (funcional PBE)
- Ones planes (70Ry)
- Codi CPMD

Metadinàmica^[7]

Mètode d'acceleració d'esdeveniments per explorar les diferents conformacions del sucre.

- Variables col·lectives: q_x, q_y, i, q_i .
- Codi CPMD acoblat a PLUMED.

Càlcul ió oxazolini a l'interior de SmChIB

El complex enzim-substrat s'ha modelat a partir de l'estructura cristal·logràfica de la SmChIB atrapada a l'etapa de l'intermedi de reacció (codi PDB: 1E6Z^[5]) i el disacàrid format per oxazolina i N-acetilglucosamina (NAG).

Dinàmica molecular clàssica

- Codi AMBER (versió 11).

Mètode híbrid de mecànica quàntica/mecànica molecular (QM/MM)^[8]

- **QM**: Disacàrid oxazolina-NAG, 55 àtoms. Codi CPMD.
- **MM**: Enzim i solvent, 86524 àtoms. Codi GROMOS.

Metadinàmica^[7]

- Variables col·lectives: q_x, i, q_i .

Resultats

Superfícies d'energia lliure conformacional

Oxazolina: Mínims energètics a les conformacions ⁴H₅, ⁰S₂ i ¹S₃. La conformació més estable és la mitja cadira ⁴H₅.

Ió oxazolini: Mínims energètics a les conformacions ⁴H₅, ⁰S₂, ³S₁, i ¹S₃/B_{3,0}. La conformació més estable és la mitja cadira ⁴H₅.

Paràmetres estructurals i electrònics

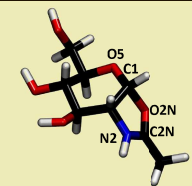
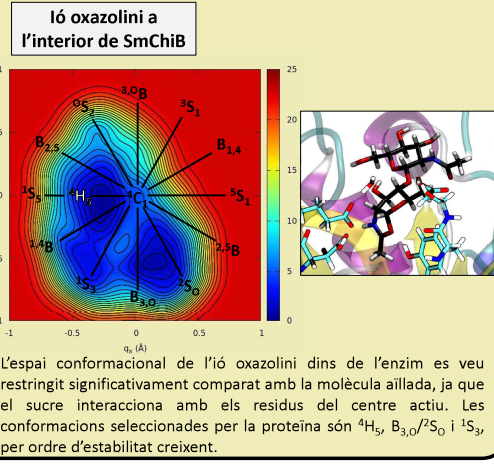
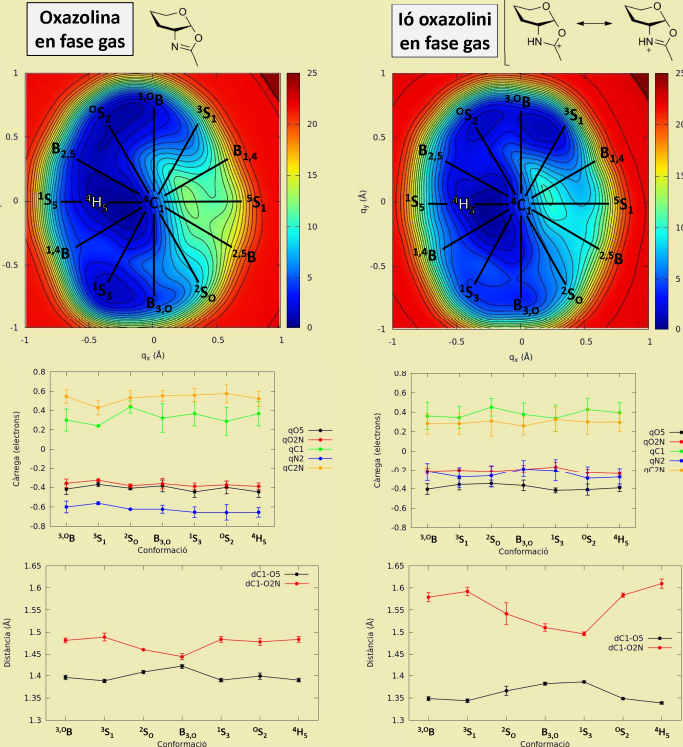


Figura 4. Representació molecular de l'ió oxazolini.

Les diferències estructurals i electròniques entre l'ió oxazolini i la molècula d'oxazolina en fase gas reflecteixen la diferència de càrrega entre les dues molècules.



L'espai conformacional de l'ió oxazolini dins de l'enzim es veu restringit significativament comparat amb la molècula aïllada, ja que el sucre interacciona amb els residus del centre actiu. Les conformacions seleccionades per la proteïna són ⁴H₅, B_{3,0}/²S₀ i ¹S₃, per ordre d'estabilitat creixent.

Conclusions

Tot i que l'enzim restringeix les conformacions accessibles per l'ió oxazolini, la conformació més estable és la mateixa que en fase gas.

La conformació més estable no és la proposada en estudis anteriors (cadira ⁴C₁), sinó la mitja cadira ⁴H₅. És necessari reavaluar l'itinerari conformacional proposat anteriorment.

Futurs càlculs: Estudi del mecanisme complet de reacció, caracteritzant la conformació del sucre en l'estat de transició, clau per al disseny d'inhibidors de quitinases.

Referències
[1] Cremer D., Pople J.A., *J. Am. Chem. Soc.* (1975) 97, 1354-1358.
[2] Svein J. H., et al., *FEBS Journal* (2006) 273, 491-503.
[3] Rinaudo M., *Prog. Polym. Sci.* (2006) 31, 603-632.
[4] Jitnonm, J. et al., *J. Phys. Chem. B* (2014) 118, 4771-4783.
[5] Van Aalten D. M. F. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98, 8979-8984.
[6] Car R., Parrinello M., *Phys. Rev. Lett.* (1985) 55, 2471-2474.
[7] Laio A., Parrinello M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2002) 99, 12562-12566.
[8] Laio A., VandeVondele J., Röthlisberger U., *J. Chem. Phys.* (2002) 116, 6941-6947.