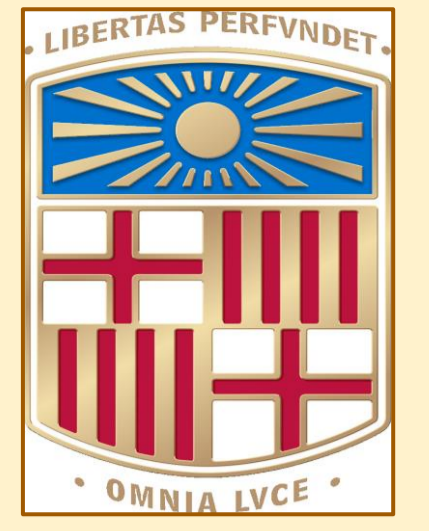


Modelització del complex de Michaelis d'un enzim glicosidasa

Albert Pla¹, Alba Nin¹, Lluís Raich¹, Carme Rovira^{1,2}

[1] Departament de Química Inorgànica i Orgànica (Secció de Química Orgànica) i Institut de Química Teòrica i Computacional (IQTCUB), Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1, 08028 Barcelona.

[2] Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Passeig Lluís Companys, 23, 08018 Barcelona.



1. Introducció

- Els enzims **glicosidasa** (GH, *Glycoside hydrolases* en anglès) hidrolitzen els enllaços entre dos unitats d'un carbohidrat.

De la **família GH124** avui en dia només s'ha caracteritzat l'estructura de l'enzim **CtCell124**^[1,2]. D'aquest, només s'ha pogut determinar que hidrolitza l'enllaç glicosídic de la cel·lulosa per un **mecanisme d'inversió de configuració** (fig. 1) i el residu que pot actuar com a **àcid general** (Glutamat 64, *Glu-64*)^[2].

- Objectiu:** identificar quin residu actua com a base general, modelitzant el complex de Michaelis.

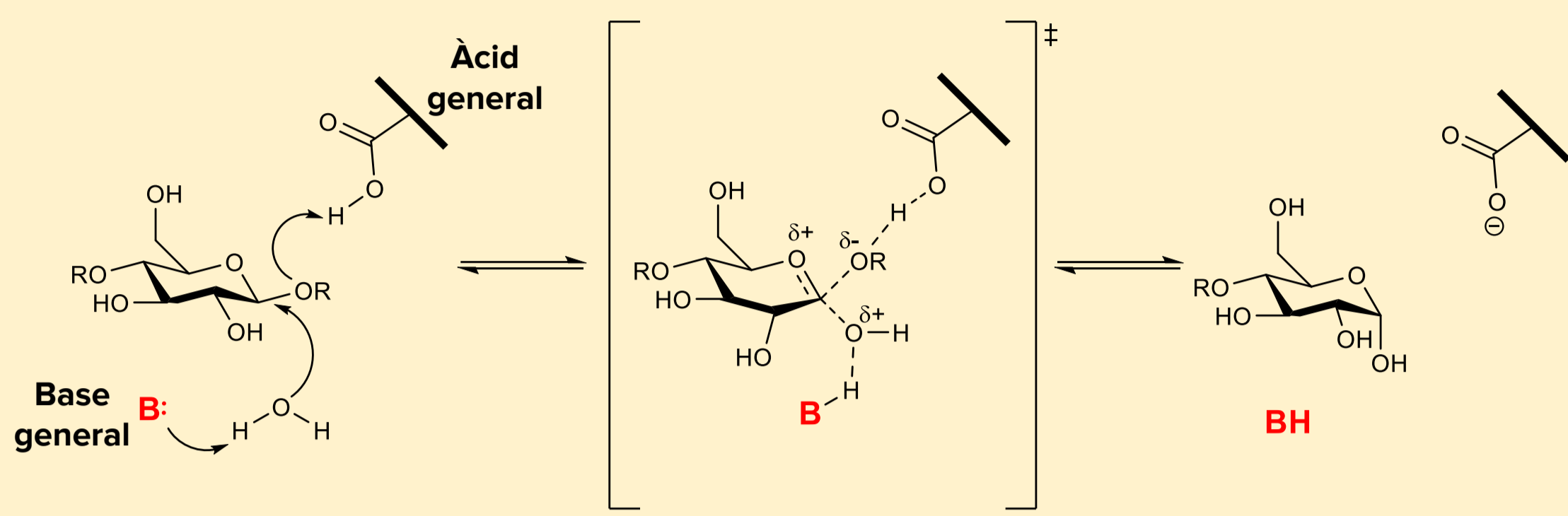


Fig. 1: Esquema del mecanisme d'hidròlisi amb inversió de configuració^[2,3].

2. Complex cristal·logràfic

En el procés de cristal·lització no s'ha obtingut una estructura del complex de Michaelis entre l'enzim CtCell124 i la cel·lohexosa.

Només s'ha obtingut l'estructura de l'enzim corresponent al producte de la hidròlisi, amb el subsite -1 vacant (fig. 2).

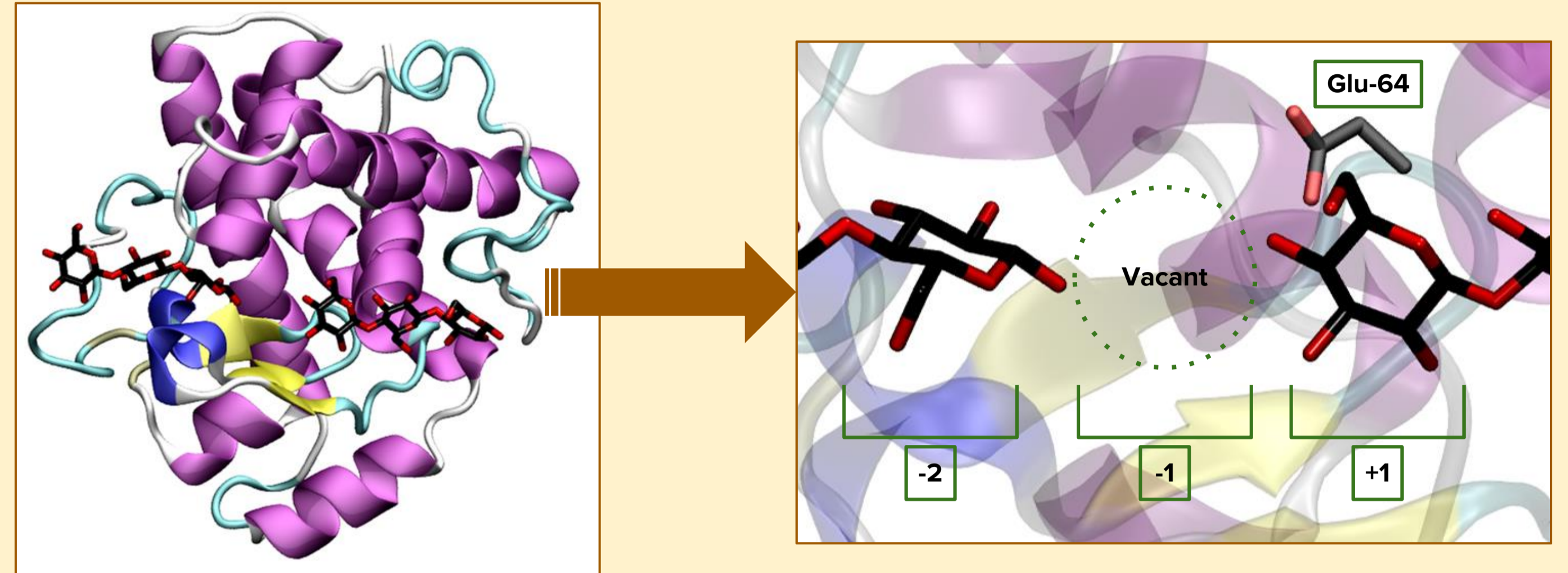


Fig. 2: Esquerra, estructura cristal·logràfica de l'enzim CtCell124 amb el producte de la hidròlisi. Dreta, centre actiu de l'enzim amb el substrat cristal·logràfic, els subsites indicats i el residu àcid (Glu-64).

3. Mètode computacional

- És conegut que un factor determinant per la reacció d'hidròlisi és la **conformació distorsionada del monòmer**,³ que es pot descriure de manera quantificada emprant les expressions de les **coordenades de Cremer i Pople** (fig. 3).⁴

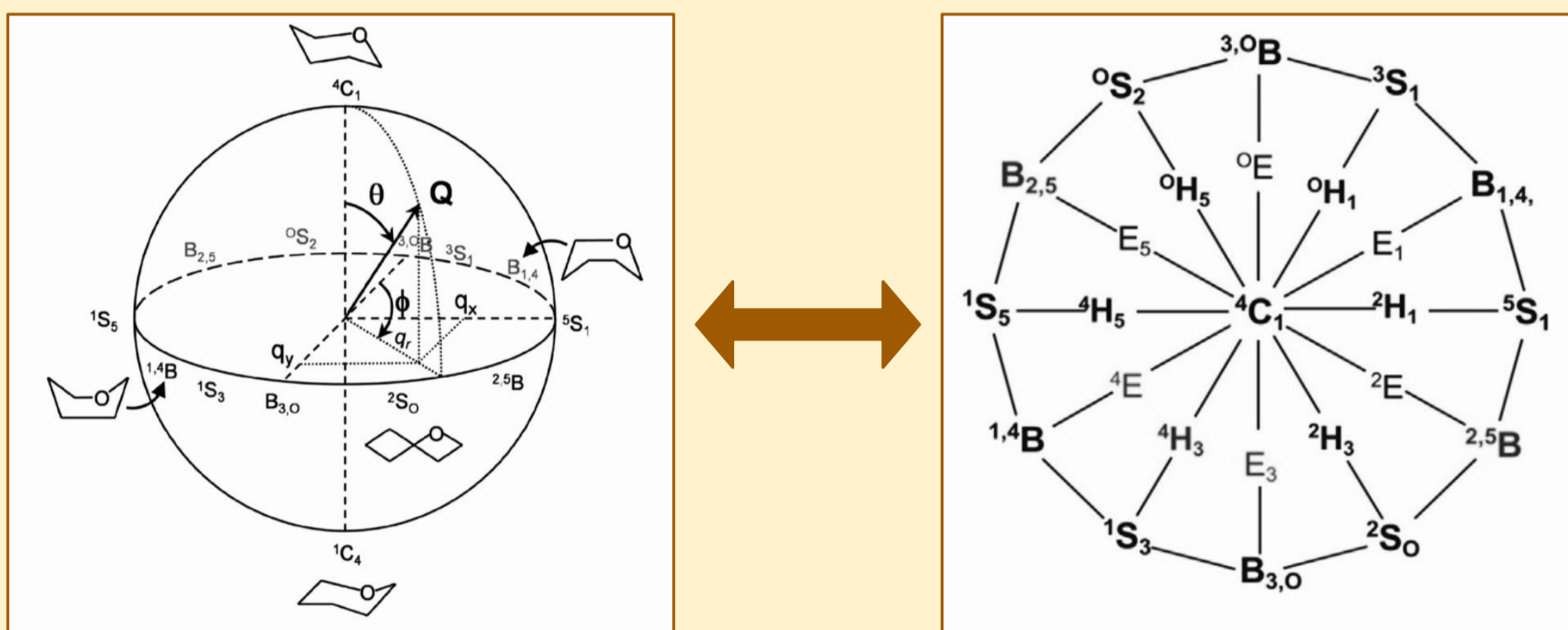


Fig. 3: Representació de les coordenades de Cremer i Pople (esq.), representació d'Stoddart (dreta).

- Model 1:** Partint de l'estructura cristal·logràfica, es realitza una **dinàmica molecular clàssica**^[5,6] i una **dinàmica molecular dirigida (Steered MD)**^[7,8] per forçar una reducció de la distància entre les dues cadenes de trihexoses (fig. 5).
- Model 2:** Partint de l'estructura cristal·logràfica s'introdueix un nou monòmer en l'espai vacant, reproduint el substrat de cel·lohexosa (fig. 4). Es realitzen trajectòries de **dinàmica molecular clàssica** i es monitoritzen les **coordenades de Cremer i Pople** i la **distància** entre el residu catalític (Glu-64) i l'enllaç glicosídic.

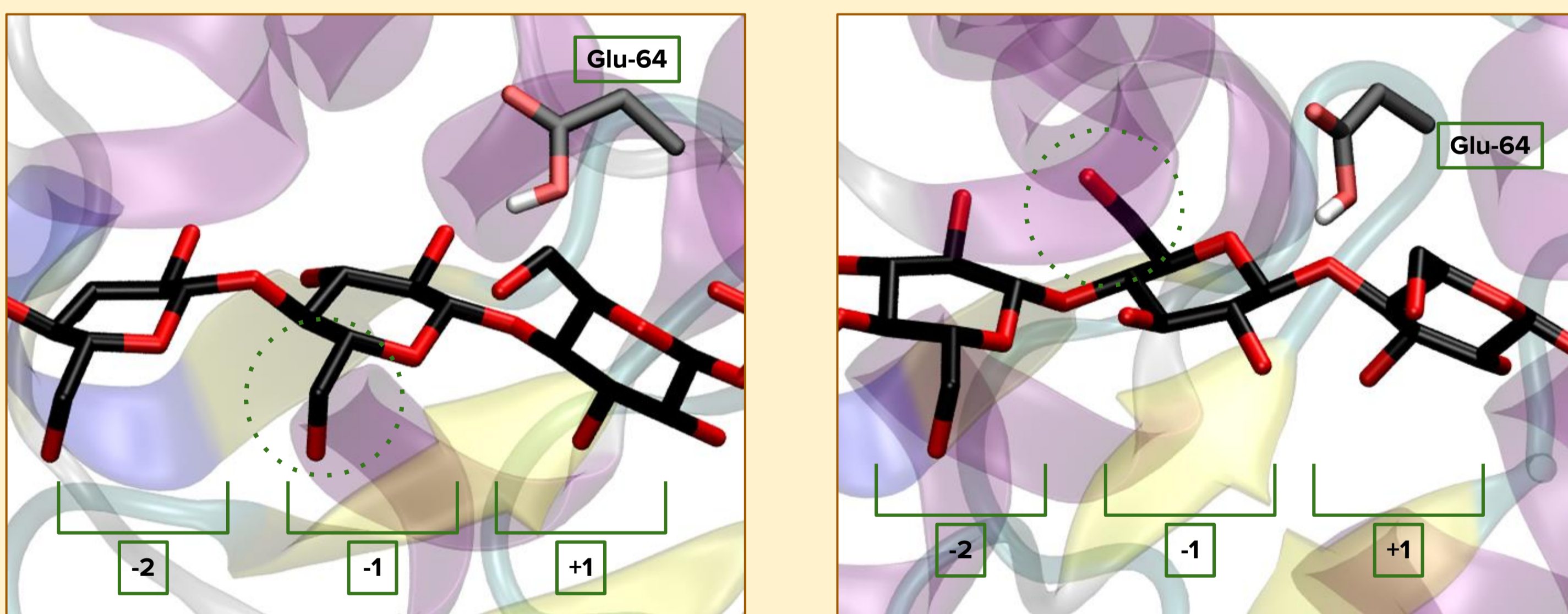
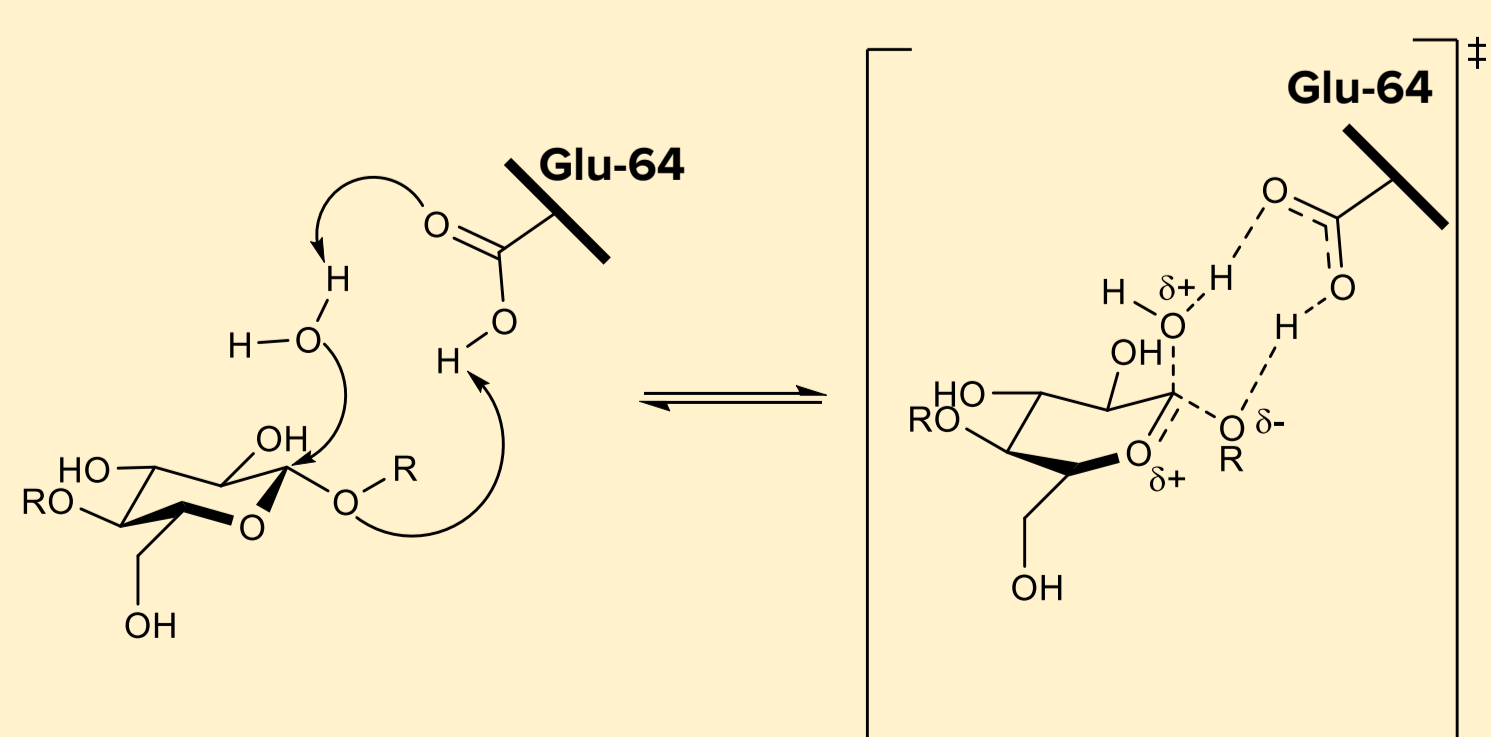


Fig. 4: Centre actiu dels complexos de Michaelis generats *in silico* amb les dues orientacions en el subsite -1.

5. Conclusions i futurs càlculs

- La dinàmica molecular clàssica ha explorat la **conformació ⁴C₁** pel sucre del subsite -1, excepte en el cas esmentat. Cal emprar **altres tècniques de simulació** (Metadinàmica, p.e.) per tal d'estudiar la conformació de l'anell.
- No s'ha identificat un residu proper que pugui actuar com a base general** en el cas que el substrat presenti una conformació alternada (fig 4., dreta).
- En cas de que el substrat es presenti en **forma no alternada** (fig 4., esq.) suggerim que el **residu Glu-64** actua de base en la reacció d'hidròlisi a través del mecanisme següent:



4. Resultats

- Model 1. Steered MD.

No es produeix **cap variació en la conformació** del sucre en reduir-se la distància (fig. 5).

L'energia necessària per generar la variació de distància és de 19.1 kcal/mol.

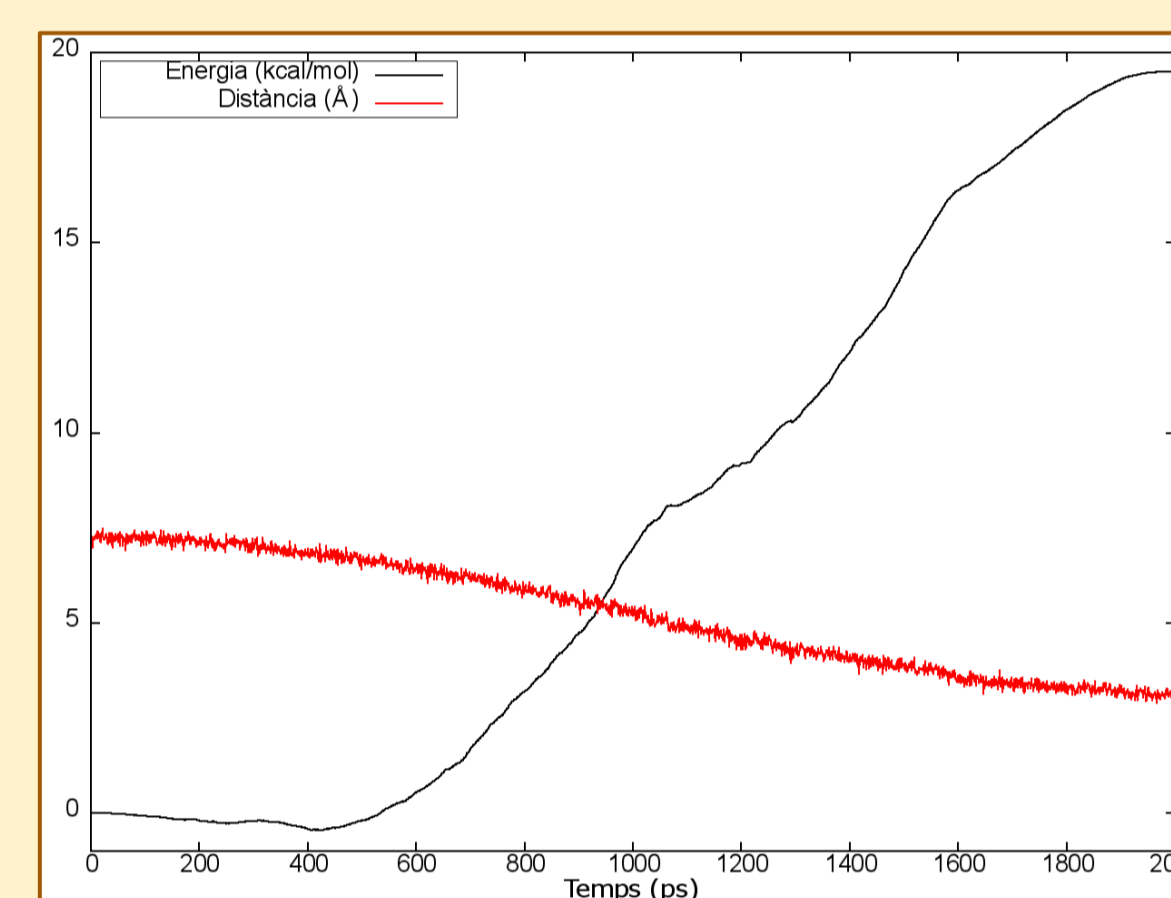
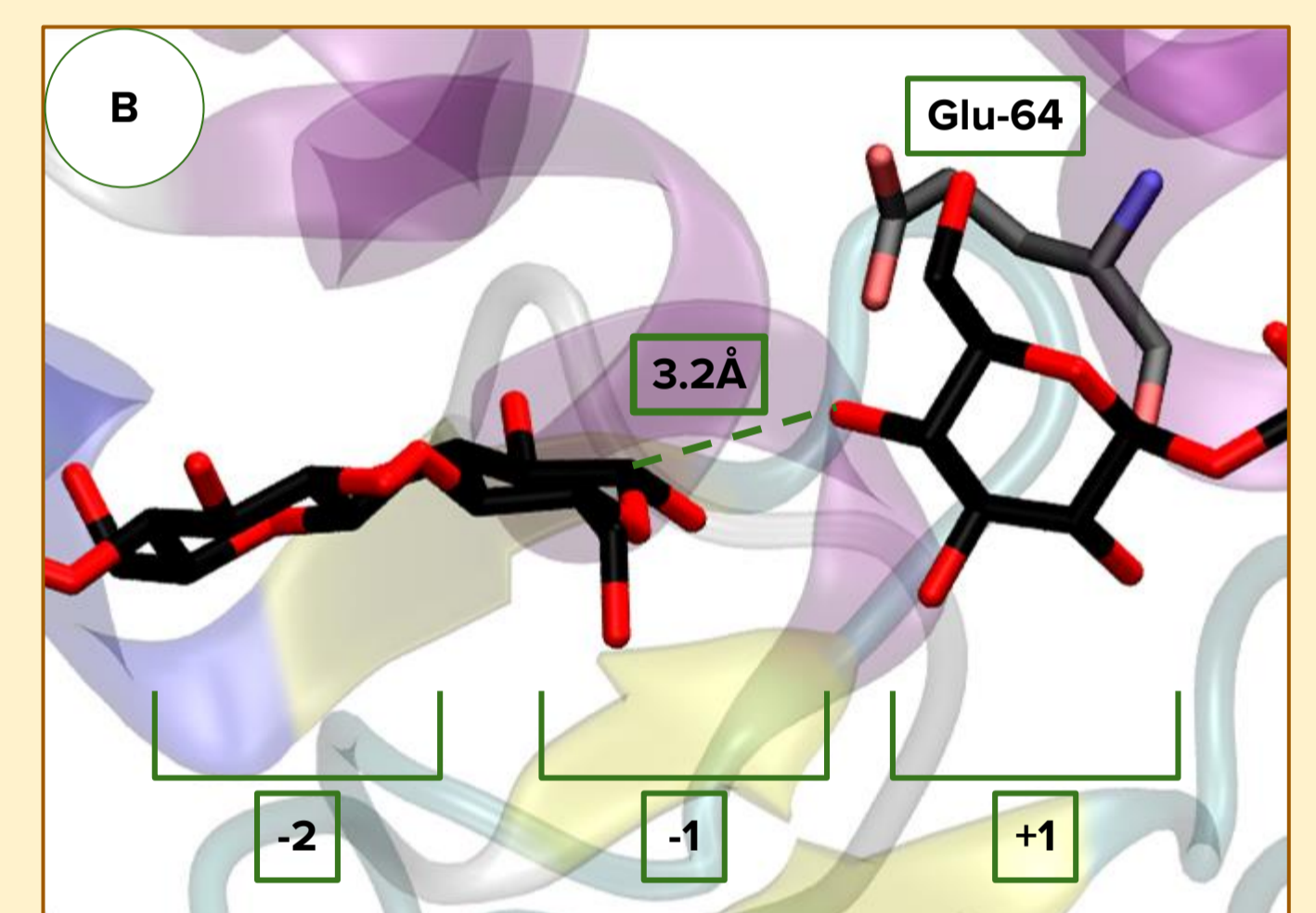
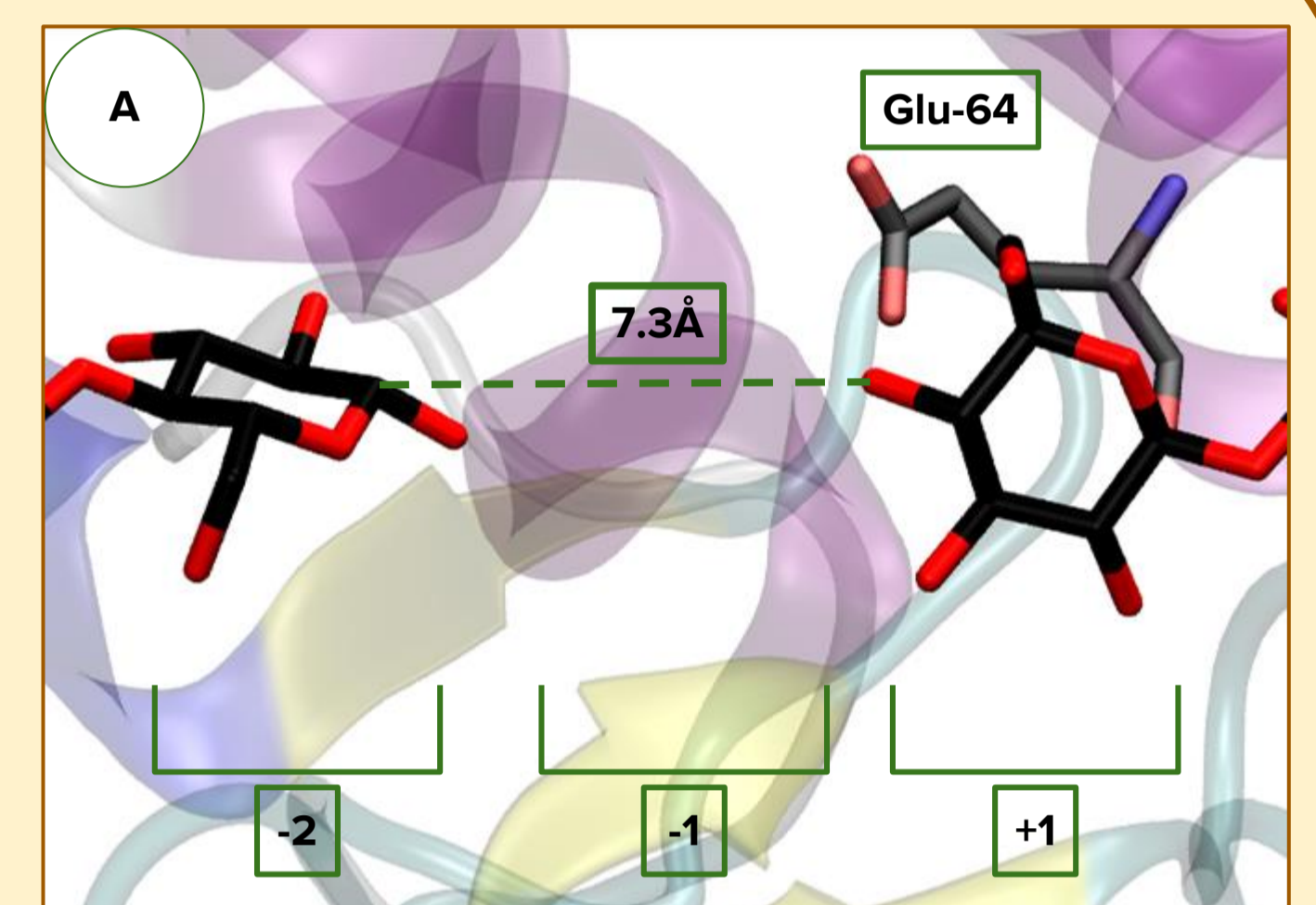


Fig. 5: En vertical, estat inicial (A) i final (B) del centre actiu en la simulació emprant *Steered MD*. S'indica el valor de la distància en angstroms. Adalt, el valor de l'energia necessària per variar la distància en funció del temps de simulació.



- Model 2. Dinàmica molecular clàssica.

Per cada complex es realitzen dues dinàmiques moleculars amb **restricció** en la posició del residu Glu-64 (25 kcal/mol) i **sense restricció**.

Pel **complex no alternat** (fig. 4, esq.) amb restricció s'observa una conformació **B_{3,0}** de l'anell (fig. 6) i una **rotació del substrat** (fig. 7).

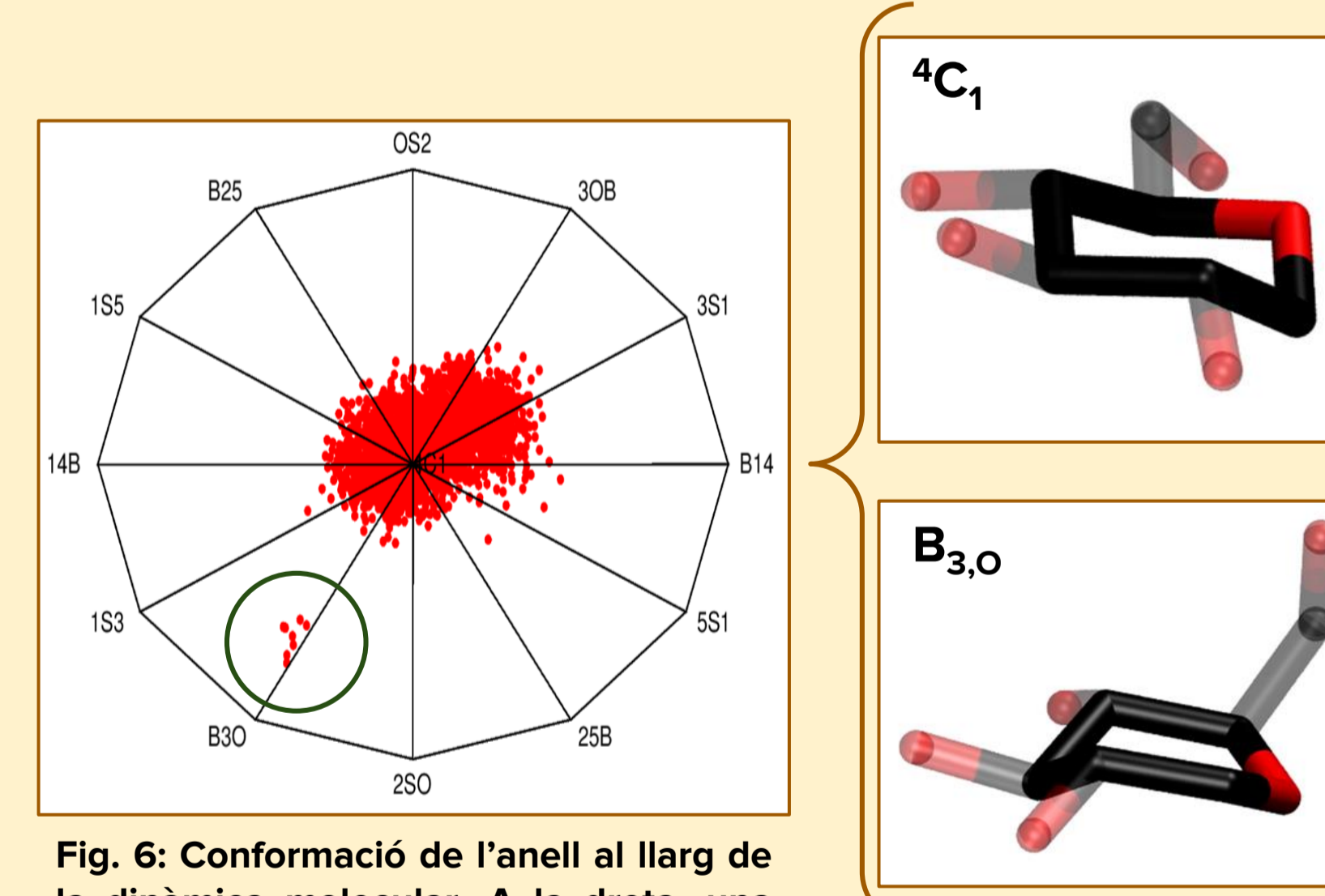


Fig. 6: Conformació de l'anell al llarg de la dinàmica molecular. A la dreta, una conformació ⁴C₁ i una B_{3,0} de l'anell.

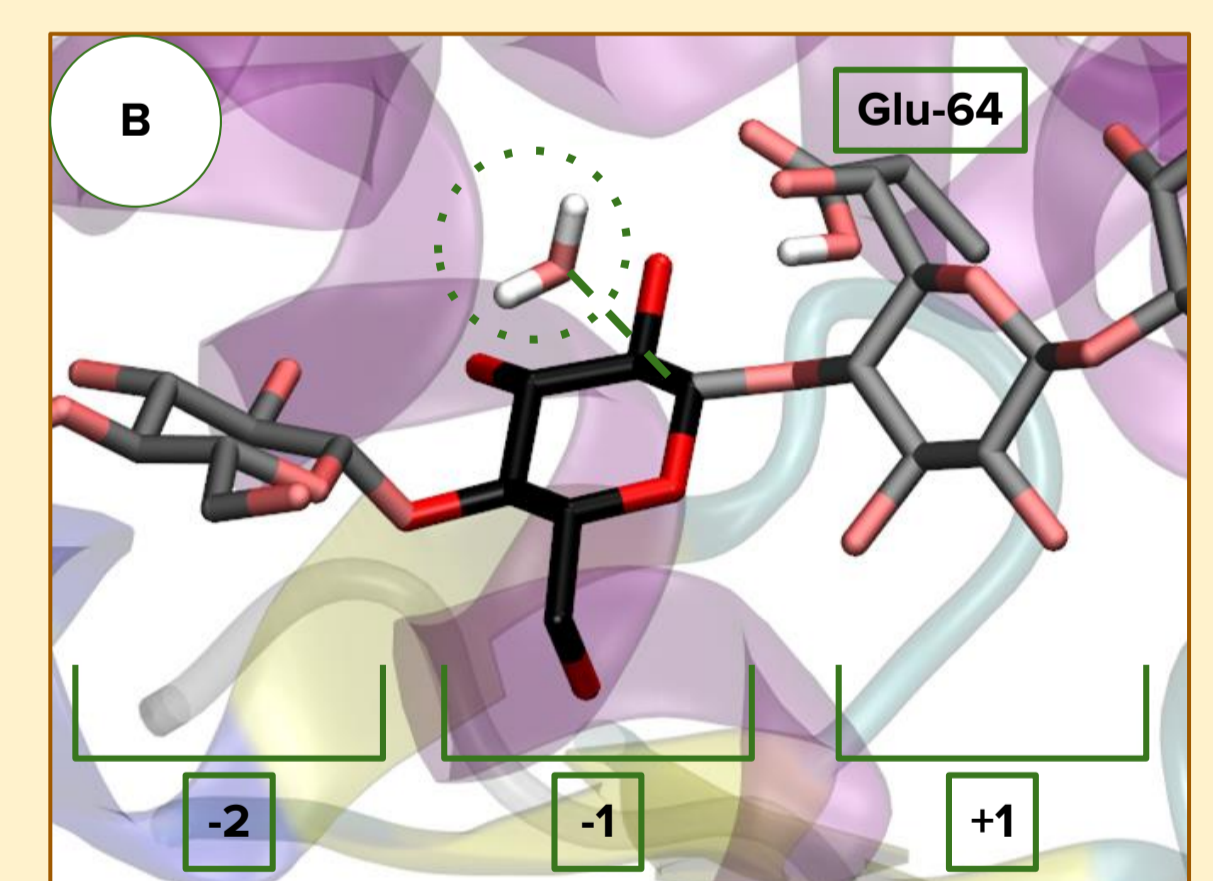
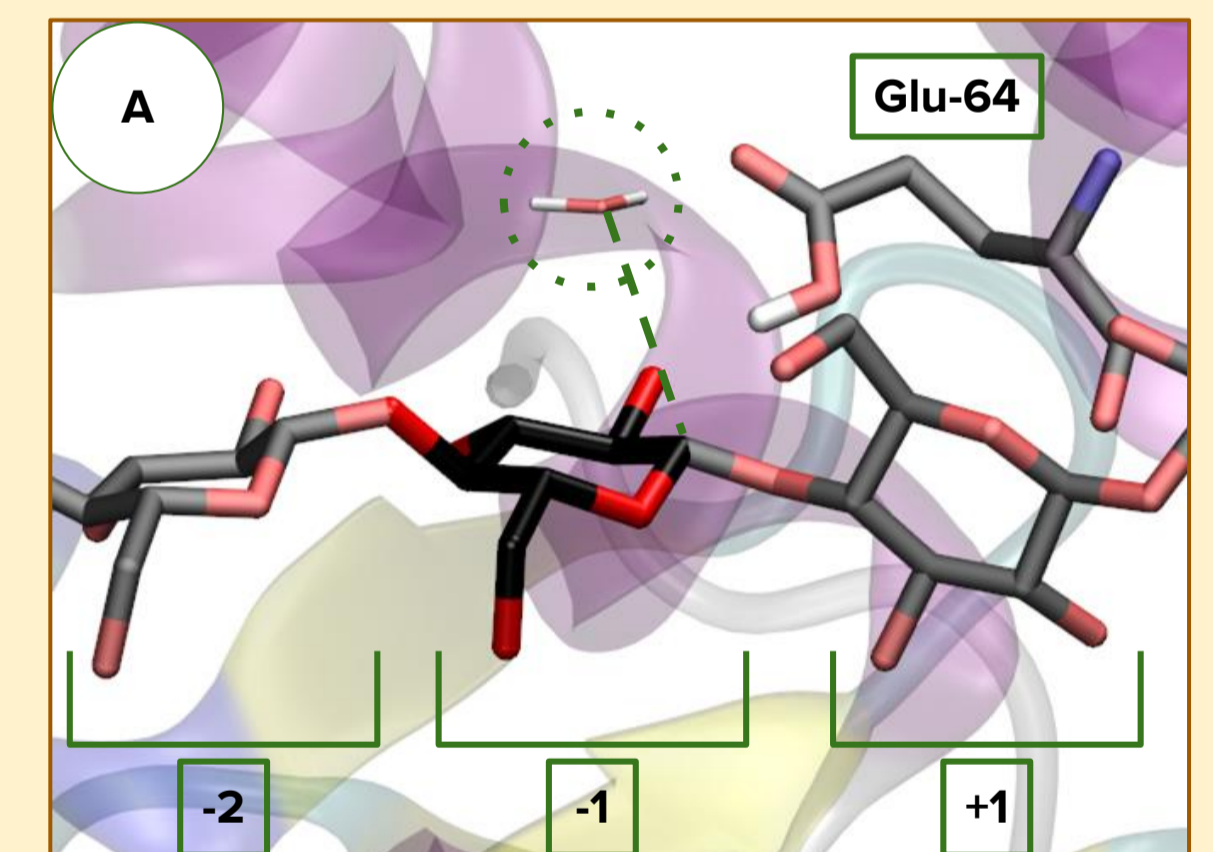


Fig. 7: Centre actiu a l'inici (A) i final (B) de la simulació. Es pot observar la rotació del substrat i dues molècules d'aigua a 2.53 i 3.60Å (línia discontinua, resp.).

Pel **complex alternat** (fig. 4, dr.) es pot observar com els residus serina 78 (Ser-78) i treonina 73 (Thr-73) **mantenen posicionada una molècula d'aigua** a una distància entorn 3.5Å al llarg de la simulació, que pot actuar de nucleòfil (fig 9). En aquest cas, **no s'observa distorsió del sucre** (fig. 8).

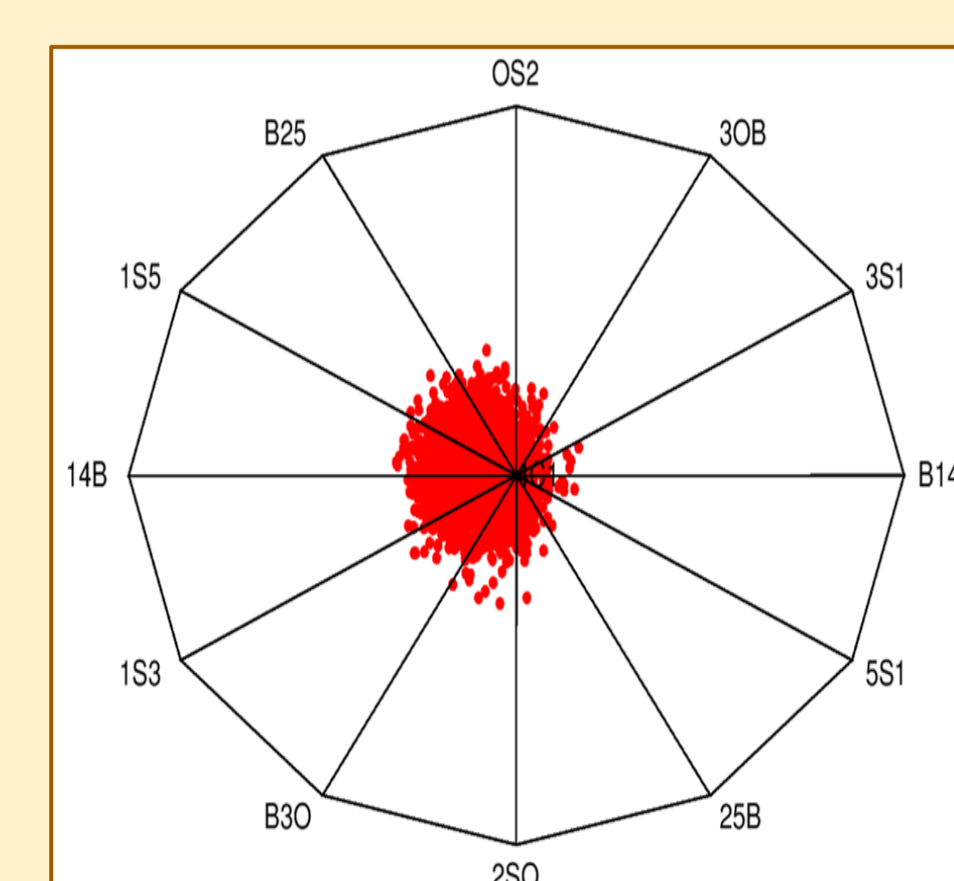


Fig. 8: Conformació de l'anell al llarg de la dinàmica molecular.

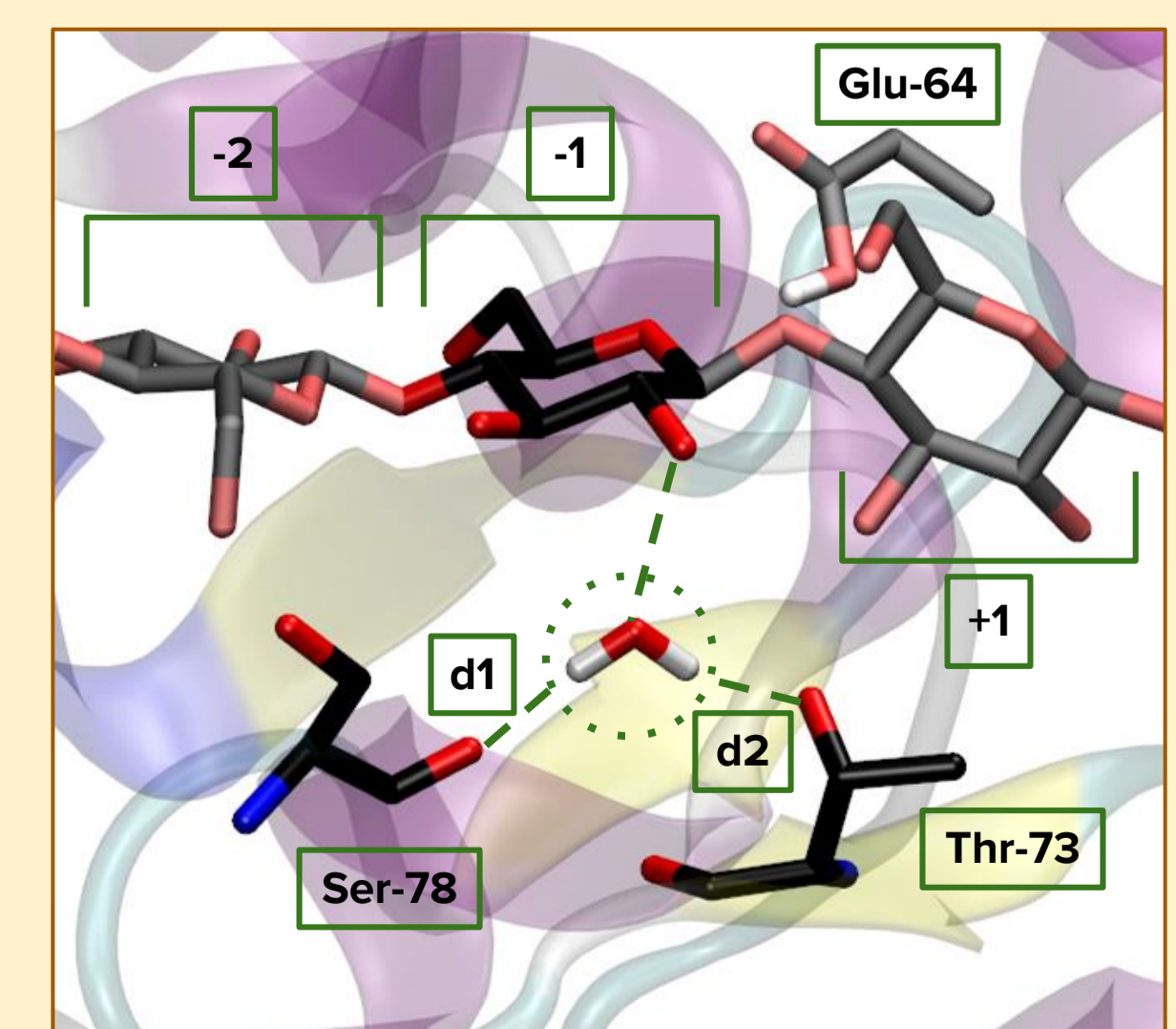


Fig. 9: Centre actiu de l'enzim. La distància entre l'aigua i el C-anomèric és de 3.65Å a la imatge. La d1 = 2.0Å i d2 = 1.9Å.

Agraïments:

- Grup de recerca de G. Davies i S. Urresti (U. de York), per l'estructura cristal·logràfica.
- Barcelona Supercomputing Center (BSC) i IQTCUB, per les hores de càlcul.



Referències:

- CazyPedia. Entrada 'GH Family 124'.
- Brás JL, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2011) 108(13), 5237-5242.
- Ardèvol, A. i Rovira, C., *J. Am. Chem. Soc.* (2015) 20(137), 7528-7547.
- Cremer, D. i Pople, J., *J. Am. Chem. Soc.* (1975) 97(6), 1354-1358.
- D.A. Case, et al., (2012), AMBER 12. U. of California, San Francisco.
- D.A. Case et al., (2014), AMBER 14. U. of California, San Francisco.
- Jarzynski, C., *Phys. Rev. Lett.* (1997) 78(13), 2690-2693
- Xiong, H. et al., *Theor. Chem. Acc.* (2006) 116(1-3), 338-346.