

David Almacellas¹, Joan Coines¹, Carme Rovira^{1,2}

[1] Departament de Química Inorgànica i Orgànica (Secció de QO) 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.

Introducció

Les **glicosil transferases (GT)** són els enzims responsables de la biosíntesi d'oligosacàrids, específicament de la formació d'enllaços glicosídics per transferència d'una unitat de carbohidrat. En la majoria d'éssers vius qualsevol alteració en aquests enzims pot acabar derivant en una formació o creixement anormal de les cèl·lules de l'organisme.

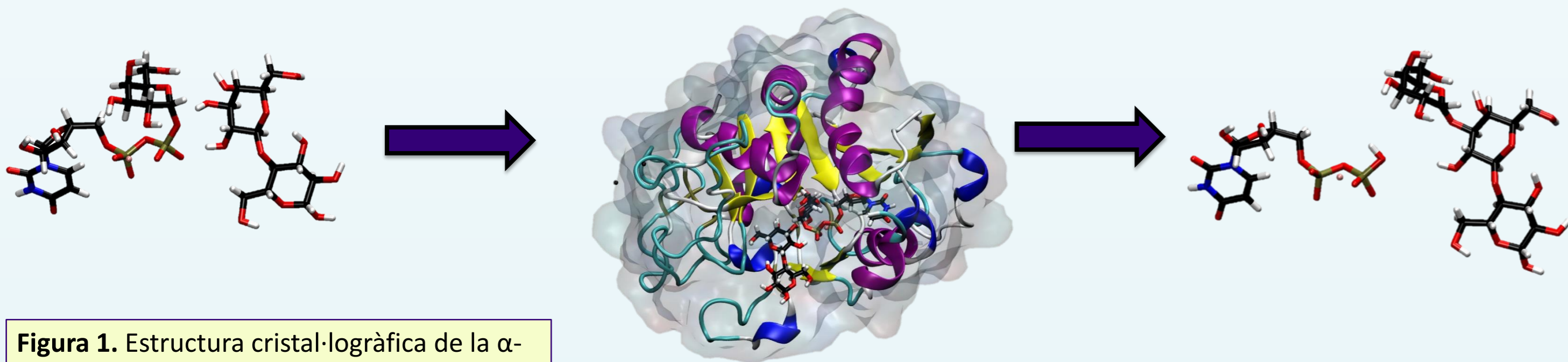


Figura 1. Estructura cristal·logràfica de l' α -1,3-galactosil transferasa (α -1,3GalT). Representació de la formació d'un trisacàrid.

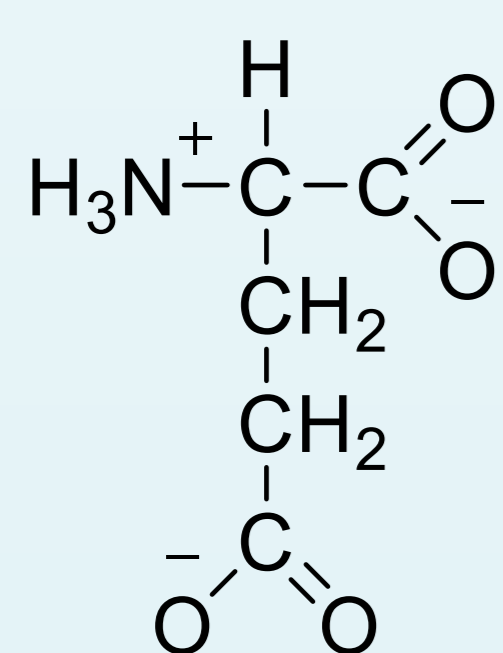


Figura 3. Estructura atòmica del residu glutamat (Glu)

En aquest treball s'estudia la α -1,3-Galactosiltransferasa, una GT6, que presenta un glutamat (Figura 3) en el centre actiu (el residu Glu³¹⁷) fent la funció de **catalitzador nucleofílic**. El nostre objectiu serà dilucidar si aquest residu, en comparació amb altres elements del centre actiu, té també importància en la orientació de l'acceptor i en la flexibilitat del complex proteic.

S'ha demostrat que la transferència del grup glicosil es pot donar a través de dos mecanismes diferents: per **retenció** o per **inversió** de la estereoquímica del carboni anomèric^[1]. Pel que fa al mecanisme de les GT que funcionen per inversió hi ha dues possibilitats: tipus **SNi²** o per **dobles desplaçament**^[3]. Només els enzims amb un residu nucleofílic en posició adequada poden seguir el mecanisme per doble desplaçament, característica exclusiva de la família **GT6**.

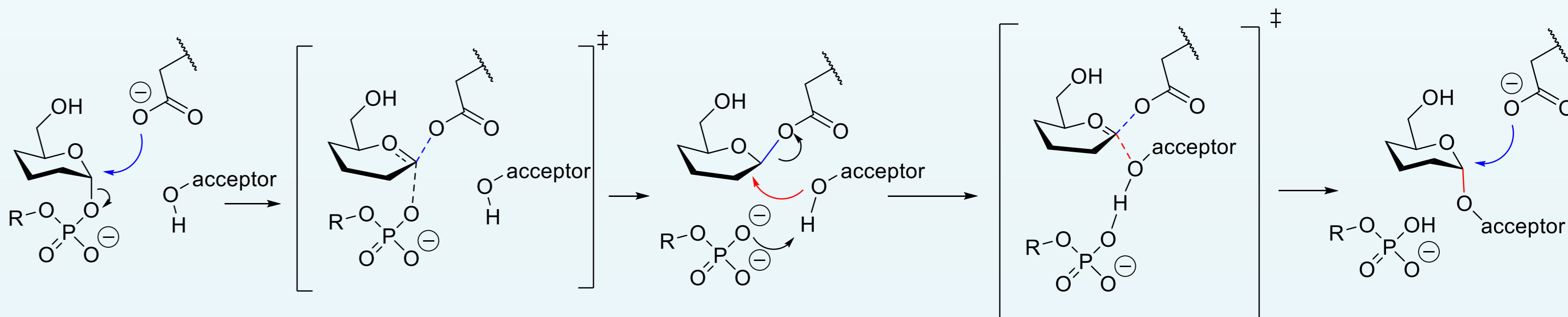


Figura 2. Exemple de reacció de les GT a través de doble desplaçament

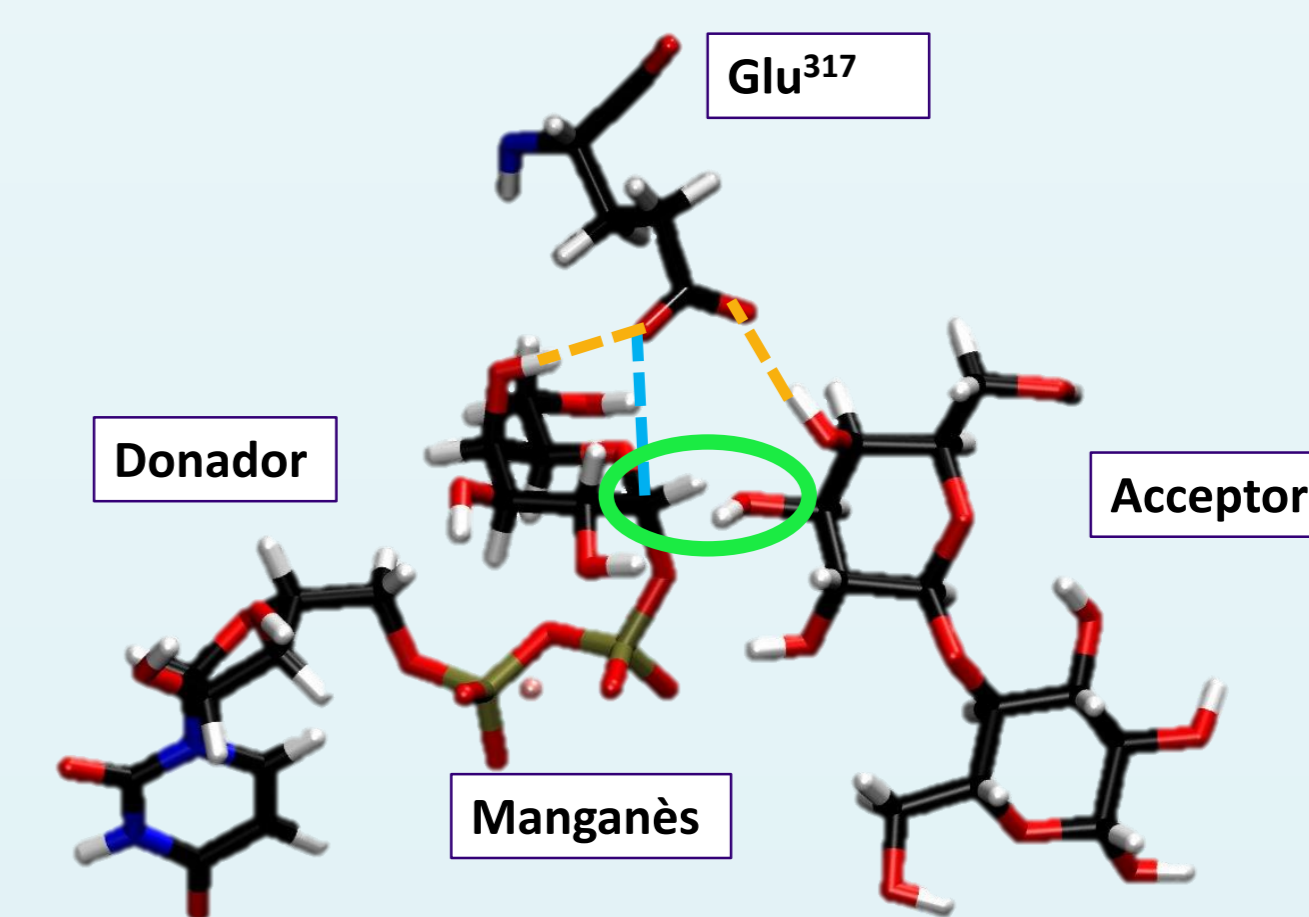


Figura 4. Rol del glutamat. Dins del cercle la distància del segon atac nucleofílic. En blau la distància del primer atac nucleofílic i en taronja punts d'hidrogen entre els sucres i l'aminoàcid catalític.

Mètodes

Dinàmica molecular clàssica

Per començar la dinàmica s'ha emprat un complex model generat a partir de la superposició de dues estructures: la UDP-2F-Gal (codi PDB: 2VFZ) i la UDP+lactosa (codi PDB: 1GWW)^[4].

Producció de mutants:

Codi AMBER (versió 14)^[5]:

1. L'extensió d'AMBER, TLEAP per tal de generar coordenades i topologia
2. Ajust de les estructures fent servir l'eina *Molefacture* del visualitzador VMD
3. Solvatació en molècules d'aigua
4. Minimització del sistema
5. Equilibració i producció durant 25 o 50 nanosegons

Mutants produïts *in silico*

Variants del residu catalític:

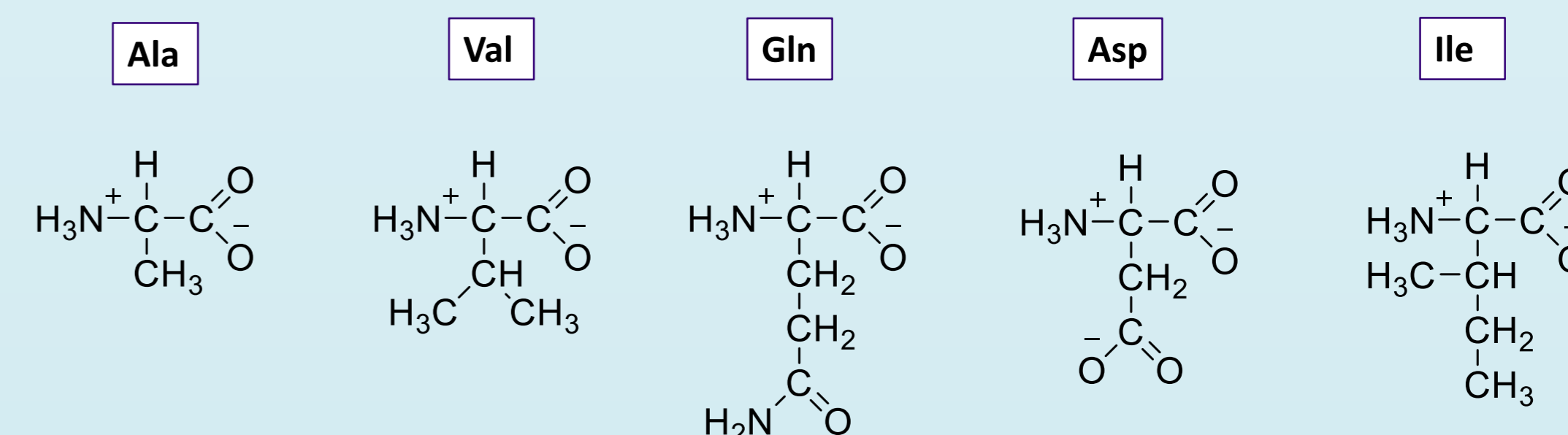
- Alanina³¹⁷
- Valina³¹⁷
- Glutamina³¹⁷
- Aspartat³¹⁷
- Isoleucina³¹⁷

Altres variants:

- Canvi de la Histidina²⁸⁰ per Alanina²⁸⁰
- Canvi de la Glutamina²⁴⁷ per Alanina²⁴⁷
- Canvi de Aspartat³¹⁶ per Alanina³¹⁶

Modificacions en els sucres:

- Canvi de la galactosa del donador a glucosa (epímer C4)
- Canvi de la lactosa de l'acceptor a maltosa (epímer C4)
- Eliminació de l'acceptor



Resultats

Canvis en l'estructura del centre actiu

Efecte estèric del residu 317 (mutants de diferent grandària): significativa conservació de la distància en el cas de l'alanina. Augment de la distància entre àtoms reactius en els cas dels altres dos residus de mida major.

Efecte de la càrrega del residu 317: només la mutació a aspartat manté el donador i l'acceptor a una distància catalítica. La mutació a glutamina és la que altera més el centre actiu.

Efecte del tipus de sucre: pronunciades oscil·lacions en la distància observades en ambdues variants.

Altres mutants: la modificació del residu 316 manté l'estructura del centre actiu, però modificacions dels residus 280 i 247 separen ambdós substrats, que ja no podrien reaccionar.

Figures 5, 6, 7 i 8. Distància entre el donador i l'acceptor (C1-O3) al llarg de la simulació

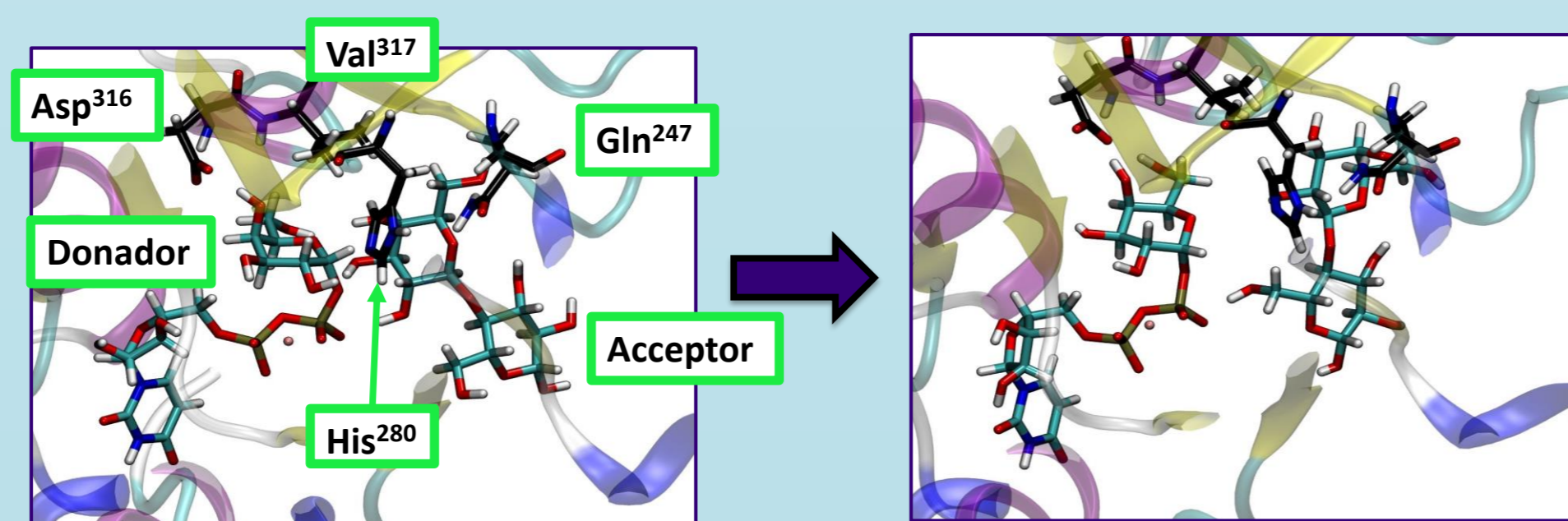
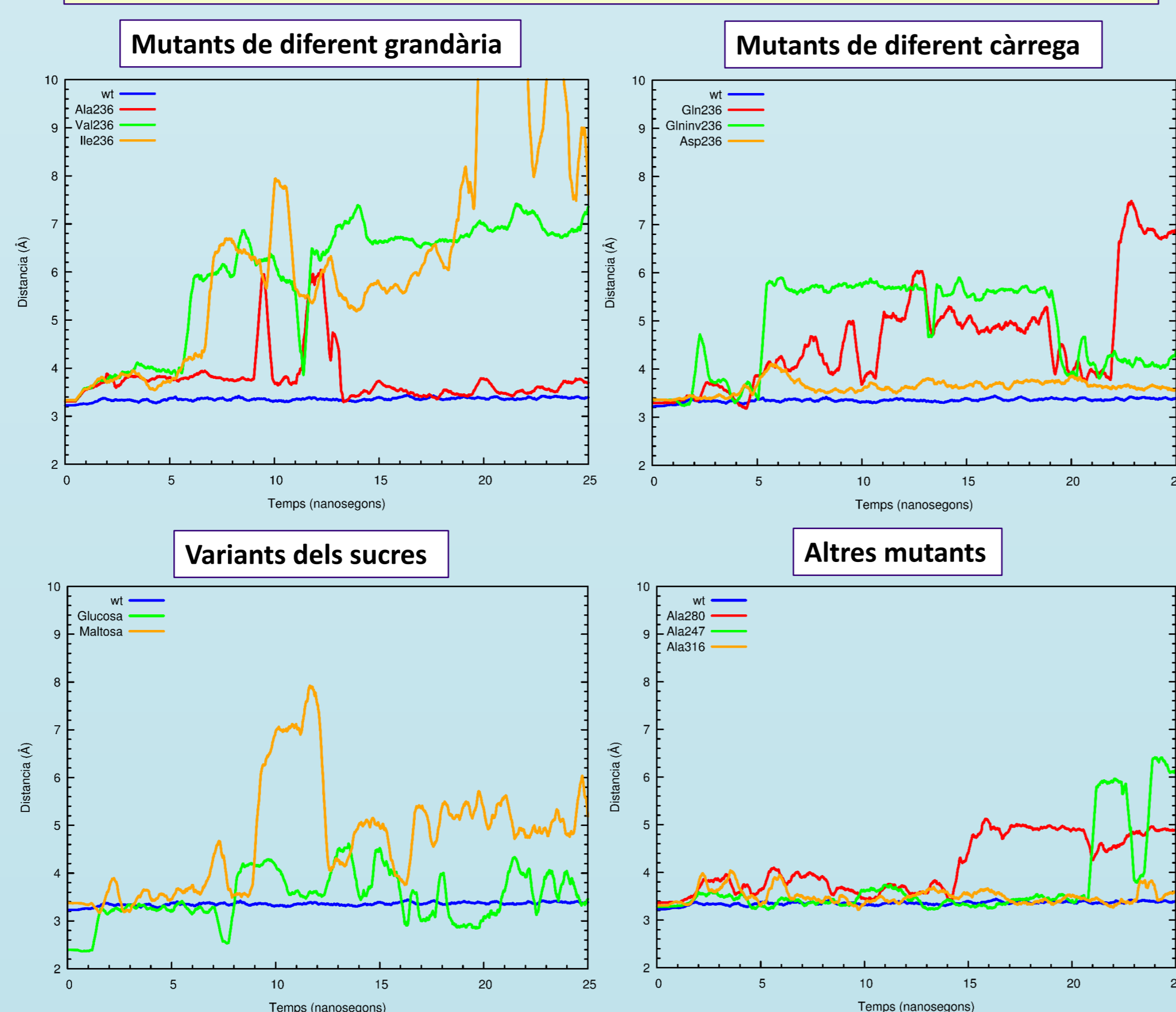
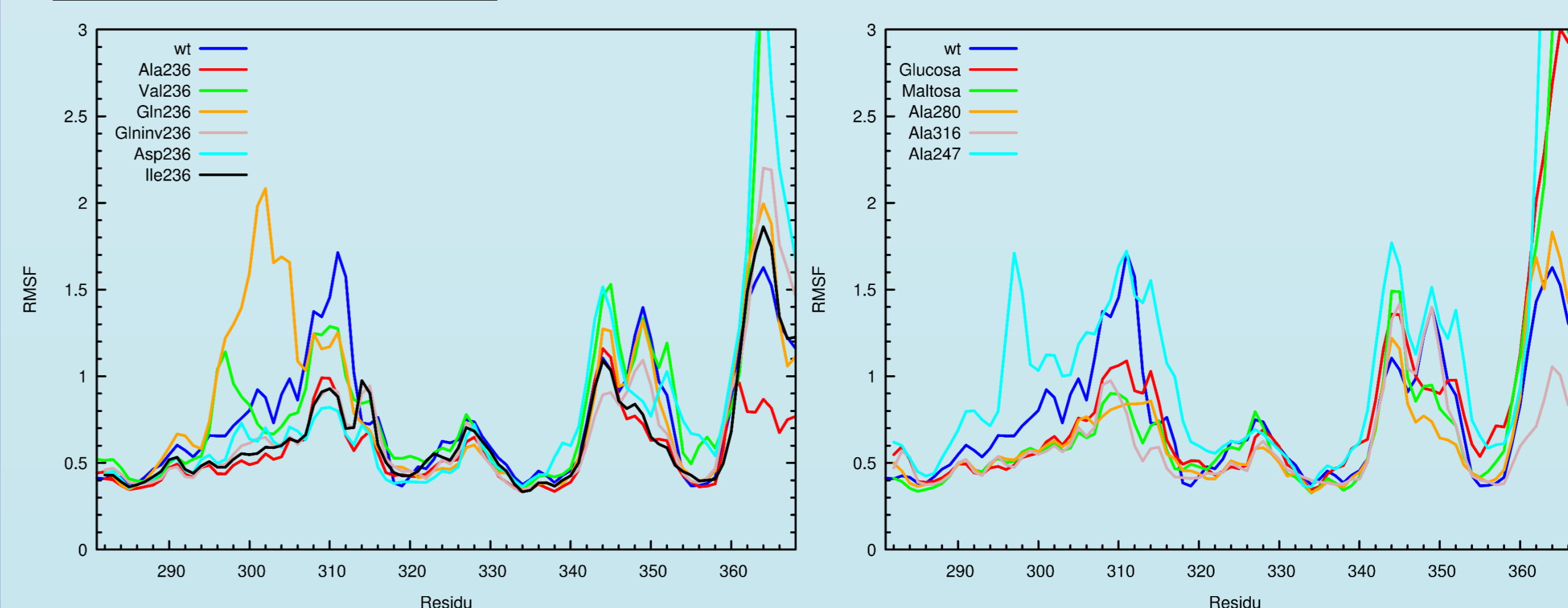


Figura 9 i 10. Inici i final de la simulació del mutant Val³¹⁷ amb un exemple

Flexibilitat de l'enzim



Figures 11 i 12. Valors de RMSF (*Root mean square fluctuation*) de tots els mutants per als residus de l'hèlix pròxima al centre catalític i el fragment C-terminal de la proteïna^[6]

El RMSF mesura la desviació de cada residu respecte la seva posició mitjana al llarg de tot el temps de simulació, és a dir, com fluctua. S'observen alteracions significatives per als residus 356-368.

Conclusions

- El centre actiu de l' α -1,3-galactosil transferasa, i en particular la posició dels substrats, depèn molt de la identitat del residu 317 i, en menor mesura, dels residus 280 i 247.

- Per ordre de rellevància, les mutacions que alteren l'estructura del centre actiu són:

Glu317Ile > Glu317Val > Glu317Gln > Glu317Ala > Glu317Asp

Aquests resultats poden ser importants a l'hora de dissenyar modificacions de l'enzim que puguin augmentar la seva eficiència catalítica.

Futurs càlculs: Estudi d'altres mutants, com ara cisteïna. Estudis dels altres estats de la reacció: intermedi i productes^[7]. Estudis de l'intercanvi de metall del centre actiu.

Referències

[1] Breton, C. et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22* (5), 540–549.
[2] Rojas-Cervellera, V. et al., *Chemistry* **2013**, *19* (42), 14018–14023.
[3] Ardèvol, A. et al., *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44* (1), 51–60.

[4] He, Y. et al., Supporting Information. *Carbon N. Y.* **2013**, 0–3.
[5] Case, D. A. et al., **2014**, AMBER 14, University of California, San Francisco.
[6] Abesa-Jové, D. et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *40*, 23–32.

[7] Soya, N. et al., *Glycobiology* **2011**, *21* (5), 547–552.