



Universitat de Barcelona

Facultat de Química

Departament de Química Física

i

Parc Científic de Barcelona

Centre especial de Recerca en Química Teòrica

**MECANISMES DE Preactivació de
SUBSTRAT EN 1,3-1,4- β -GLUCANASA**
MODELITZACIÓ MITJANÇANT DINÀMICA MOLECULAR
DE PRIMERS PRINCIPIS

Memòria presentada per XEVI BIARNÉS FONTAL
per tal d'optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona.
Programa de doctorat de Biotecnologia (bienni 2003-2005).

Aquesta tesi ha estat realitzada al Parc Científic de Barcelona, sota la direcció
de la Dra. Carme Rovira i Virgili, Professora d'Investigació ICREA,
comptant amb la tutoria del Dr. Fausto Sanz Carrasco, Catedràtic del Departament de
Química Física de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, setembre de 2007

Aquesta tesi ha estat realitzada amb el suport
d'una beca predoctoral del *Parc Científic de Barcelona*.

a la Montse,

la companya permanent de tots els viatges,
i que tant ha col·laborat a que aquest projecte tirés endavant.

l'escriptura dels agraïments és un moment especial; és el que deixes pel final i saps que en el fons serà la part de la tesi que la majoria de la gent es llegirà primer (inclús potser l'única part que s'arribarà a llegir), m'equivoco?

és el moment idoni per agrair

el *suport* i la *predisposició*, en tot moment, de qui m'ha iniciat i guiat al llarg d'aquest camí;

l'*entusiasme* i l'*esperit de col·laboració* de qui ha estat també un guia en aquest camí;

les *hores compartides* amb els companys de viatge;

la *comprensió* i l'*interès* dels companys d'altres viatges,
en especial en els moments d'absentisme;

el *recolzament desinteressat* dels més propers, tot i la peculiaritat d'alguns,
però sempre amb la millor intenció;

l'*hospitalitat* dels qui he conegut en camins llunyans, per haver-me fet sentir com a casa;

l'*interès* de qui s'està llegint el resum d'aquest viatge.

continguts

sumari

Els hidrats de carboni presenten una elevada variabilitat estereoquímica i els organismes s'aprofiten d'aquesta elevada variabilitat utilitzant oligosacàrids i polisacàrids per a una multitud de diferents funcions biològiques. A part de les típiques funcions estructurals i d'emmagatzematge energètic, tenen important rellevància en altres funcions molt més específiques, com per exemple en senyalització cel·lular. Aquesta funcionalitat desperta l'interès de multitud d'aplicacions biotecnològiques, que són el fruit d'un nombre creixent d'estudis en glicobiologia.

L'enllaç glicosídic, en especial entre dues unitats de glucosa, és un dels enllaços més estables que es troben en biopolímers naturals. El temps de vida mitja de la hidròlisi espontània d'aquest enllaç en cel·lulosa i en midó és de l'ordre dels 5 milions d'anys. Les glicosil hidrolases són els enzims responsables de la hidròlisi enzimàtica d'aquests biopolímers. Aquests enzims aconseguen portar a terme la hidròlisi en escales de temps de l'ordre de 1000 cicles per segon. Donada aquesta elevada activitat, les glicosil hidrolases són considerades un dels catalitzadors biològics més eficients.

La present tesi centra el seu principal interès en l'estudi de la formació del complex de *Michaelis* entre una glicosil hidrolasa de la família 16 (la 1,3-1,4- β -glucanasa) i el seu corresponent substrat. Entendre el procés en el que el substrat s'uneix a l'enzim és un punt clau de cara a raonar les següents etapes de qualsevol mecanisme enzimàtic. Sovint aquest procés ja porta associats canvis conformacionals tant a nivell d'enzim com de substrat que contribueixen a la catàlisi, fent variar les diferències energètiques en el pas de reactius a productes. Per a les β -glicosil hidrolases, existeixen diferents evidències experimentals que recolzen aquest fet. Així, s'observen estructures distorsionades a nivell de substrat respecte les que correspondrien a les estructures més estables en solució. De totes maneres, es desconeixen els factors que determinen que el substrat prefereixi unir-se a l'enzim en una conformació o una altra, i les implicacions mecanístiques que això té. La present tesi tracta de donar resposta a algunes d'aquestes qüestions emprant diferents tècniques de dinàmica molecular (clàssica i de primers principis) en combinació amb mètodes que permeten l'acceleració d'esdeveniments al llarg d'una simulació.

La present tesi està estructurada en tres grans blocs: un bloc introductori (capítols I i II) on s'introdueix la família d'enzims a la qual pertany la 1,3-1,4- β -glucanasa i s'estableixen els objectius generals del present estudi; al capítol II es resumeixen els fonaments de la metodologia computacional emprada. En un segon bloc (capítols III a VII) es descriuen les simulacions portades a terme per tal de donar resposta a les preguntes obertes plantejades al bloc introductori. Els resultats són analitzats i discutits en cinc capítols diferents: al capítol III s'analitza l'estructura del complex de *Michaelis* de la 1,3-1,4- β -glucanasa amb un substrat tipus metilumbeliferil-tetrasacàrid; al capítol IV s'avalua i es descriu el mapa d'energia lliure conformacional de l'anell de β -D-glucopiranososa, i s'analitzen les propietats estructurals i electròniques de cada conformació per tal de trobar una correlació amb les distorsions presents en diferents glucosidases; al capítol V s'avalua i es descriu el mapa d'energia lliure conformacional del substrat un cop unit a la 1,3-1,4- β -glucanasa, i s'analitza l'efecte de diferents mutacions puntuals del substrat; al capítol VI es porta a terme una simulació del primer pas de la reacció enzimàtica de la 1,3-1,4- β -glucanasa i s'analitza l'itinerari conformacional seguit pel substrat; al capítol VII es porta a terme una simulació del procés d'entrada del substrat a la cavitat enzimàtica i s'analitzen les reorganitzacions a nivell de substrat i de proteïna que tenen lloc al llarg del procés. Cada capítol conté una breu introducció específica de cada cas concret, informació sobre els detalls computacionals emprats, i la descripció i discussió dels resultats obtinguts. Finalment al darrer bloc (capítol VIII) es resumeixen els resultats més rellevants obtinguts en la present tesi i s'enumeren les principals conclusions. Addicionalment, s'han adjuntat tres annexes que complementen la informació dels diferents capítols.

SUMARI	VII
CONTINGUTS	IX
SÍMBOLS I ACRÒNIMS	XV

CAPÍTOL I INTRODUCCIÓ	1
I.1. Les Glicosil Hidrolases	3
<i>I.1.1. Classificació.....</i>	3
<i>I.1.2. Estructura</i>	4
<i>I.1.3. Mecanisme Catalític</i>	5
<i>I.1.4. Complex de Michaelis.....</i>	9
I.2. Conformacions de β -D-Glucopiranososa.....	12
<i>I.2.1. Nomenclatura</i>	12
<i>I.2.2. Itinerari Seguit en Diferents Glicosil Hidrolases.....</i>	17
I.3. 1,3-1,4- β -glucans.....	20
I.4. La 1,3-1,4- β -glucanasa.....	22
<i>I.4.1. Mecanisme Enzimàtic.....</i>	23
<i>I.4.2. Estructura</i>	23
<i>I.4.3. Interaccions Enzim – Substrat.....</i>	26
I.5. Preguntes Obertes	27

OBJECTIUS.....	29
-----------------------	-----------

CAPÍTOL II FONAMENTS METODOLÒGICS	33
II.1. Mètode <i>Car-Parrinello</i> de Dinàmica Molecular (CPMD).....	35
<i>II.1.1. Temps de Simulació i Massa Electrònica Fictícia.....</i>	37
II.2. Mètode QM/MM de Dinàmica Molecular	39
<i>II.2.1. Interaccions Electrostàtiques QM–MM.....</i>	40
<i>II.2.2. Regió Frontera QM–MM.....</i>	41
II.3. Mètode d'Acceleració d'Esdeveniments (metadinàmica)	42
<i>II.3.1. Variables Col·lectives</i>	45
<i>II.3.2. Metadinàmica Acoblada al Lagrangiana de Car-Parrinello</i>	46
<i>II.3.3. Metadinàmica en Múltiples Coordenades.....</i>	49

CAPÍTOL III DISTORSIÓ DEL SUBSTRAT EN EL COMPLEX DE MICHAELIS DE LA 1,3-1,4- β -GLUCANASA53

III.1. Introducció i Objectius	55
III.2. Detalls Computacionals i Simulacions Prèvies.....	56
III.2.1. Estructures Inicials del Complex Enzim-Substrat.....	56
III.2.2. Equilibració del Complex E·S	57
III.2.3. Models QM del Substrat en Fase Gas.....	61
III.2.4. Models QM/MM del Complex de Michaelis.....	62
III.2.5. Paràmetres de les Simulacions QM.....	63
III.2.6. Paràmetres de les Simulacions QM/MM.....	65
III.3. Resultats i Discussió.....	67
III.3.1. Simulacions del Substrat en Fase Gas.....	67
III.3.2. Simulacions del complex de Michaelis	76
III.4. Resum i Conclusions	88

CAPÍTOL IV MAPA D'ENERGIA LLIURE CONFORMACIONAL DE β -D-GLUCOPIRANOSA91

IV.1. Introducció.....	93
IV.2. Detalls Computacionals.....	94
IV.2.1. Definició de les Variables Col·lectives.....	94
IV.2.2. Estructura Inicial.....	95
IV.2.3. Paràmetres de Simulació	95
IV.3. Resultats i Discussió	99
IV.3.1. Evolució de la Trajectòria	99
IV.3.2. Mapa Conformacional d'Energia Lliure	102
IV.3.3. Canvis Estructurals	109
IV.3.4. Canvis Electrònics.....	111
IV.3.5. Implicacions Mecanístiques en β -glucosidases	112
IV.4. Conclusions.....	115

CAPÍTOL V MAPA D'ENERGIA LLIURE CONFORMACIONAL DEL SUBSTRAT UNIT A LA 1,3-1,4- β -GLUCANASA 117

V.1. Introducció i Objectius.....	119
V.2. Detalls Computacionals.....	123
V.2.1. Estructures de Partida.....	123
V.2.2. Paràmetres de Simulació.....	123
V.3. Resultats i Discussió (substrat 2-oxi).....	125
V.3.1. Evolució de la Trajectòria.....	125
V.3.2. Mapa Conformacional d'Energia Lliure.....	127
V.3.3. Flexibilitat Conformacional del Substrat.....	130
V.3.4. Reorganització de l'Entorn Proteic.....	134
V.4. Resultats i Discussió (substrats 2-fluor / 2-desoxi).....	136
V.4.1. Conformació del Substrat 2-fluor.....	136
V.4.2. Conformacions del Substrat 2-desoxi.....	138
V.5. Resultats i Discussió (itineraris de reacció).....	145
V.5.1. Itinerari Proposat per a un Substrat 2-oxi.....	146
V.5.2. Itineraris Proposats per a un Substrat 2-desoxi.....	146
V.6. Conclusions.....	154

CAPÍTOL VI PRIMER PAS DE LA REACCIÓ ENZIMÀTICA DE LA 1,3-1,4- β -GLUCANASA 155

VI.1. Introducció i Objectius.....	157
VI.2. Detalls Computacionals.....	159
VI.2.1. Estructura de Partida i Model Teòric.....	159
VI.2.2. Paràmetres de Simulació.....	160
VI.3. Resultats i Discussió.....	164
VI.3.1. Trajectòria de Reacció.....	164
VI.3.2. Mapa d'Energia Lliure de Reacció.....	167
VI.3.3. Anàlisi de l'Estat de Transició.....	170
VI.4. Resum i Conclusions.....	174

CAPÍTOL VII CAMÍ D'ENTRADA DEL SUBSTRAT A LA CAVITAT ENZIMÀTICA DE LA 1,3-1,4-β-GLUCANASA.....	175
VII.1. Introducció i Objectius	177
VII.2. Detalls Computacionals.....	179
VII.2.1. Estructura de Partida.....	179
VII.2.2. Paràmetres de Simulació (metadinàmica estàndard).....	180
VII.2.3. Paràmetres de Simulació (bias exchange metadynamics).....	183
VII.3. Resultats i Discussió (metadinàmica estàndard)	187
VII.3.1. Sortida del Substrat de la Cavitat Enzimàtica	187
VII.3.2. Flexibilitat del Substrat i de l'Entorn Proteic	189
VII.3.3. Entrada del Substrat a la Cavitat Enzimàtica	192
VII.4. Resultats i Discussió (camp de forces GLUCAX)	196
VII.4.1. Ajust dels Termes Enllaçants	198
VII.4.2. Ajust de la Transició skew – cadira	199
VII.4.3. Ajust de les Càrregues Atòmiques	201
VII.5. Resultats i Discussió (bias exchange metadynamics)	203
VII.5.1. Superfícies d'Energia Lliure	204
VII.6. Resum i Conclusions.....	210
CAPÍTOL VIII RESUM FINAL I CONCLUSIONS	213
PUBLICACIONS I COMUNICACIONS EN CONGRESSOS	219
BIBLIOGRAFIA	223
ANNEX A PROGRAMARI	235
A.1. Implementació Coordenades d'Empaquetament	237
ANNEX B PROTOCOLS DE SIMULACIÓ	253
B.1. Dinàmica Molecular Clàssica (MM).....	255
B.2. Dinàmica Molecular CPMD (QM)	257
ANNEX C CAMP DE FORCES GLUCAX	259
C.1. Paràmetres Enllaçants	261
C.2. Paràmetres No Enllaçants	266

símbols i acrònims

Å	Angstrom
ALPH	Teoria del control estereoelectrònic (<i>Antiperiplanar Lone Pair Hypothesis</i>)
B3LYP	tipus de funcional de bescanvi i correlació electrònica
BE-META	<i>Bias Exchange Metadynamics</i>
BO-MD	Dinàmica Molecular de <i>Born-Openheimer</i>
BP	tipus de funcional de bescanvi i correlació electrònica
CP	mètode <i>Car-Parrinello</i>
CPMD	Dinàmica Molecular de <i>Car-Parrinello</i>
CV	Variable Col·lectiva
E·P	complex Enzim-Producte
E·S	complex Enzim-Subtrat
ESP	càrregues atòmiques ajustades al Potencial Electrostatic
fs	FemtoSegon
GH	Glicosil Hidrolasa
H	Hartree
K	Kelvin
MM	Mecànica Molecular
MU	MetilUmbeliferona
nm	NanòMetre
ns	NanoSegon
PBE	tipus de funcional de bescanvi i correlació electrònica
PCA	Anàlisi de Components Principals
ps	PicoSegon
QM	Mecànica Quàntica
RESP	càrregues atòmiques ajustades al Potencial Electrostatic amb Restricció
rmsd	desplaçament promig
Ry	Rydberg
TS	Estat de Transició
u.a.	Unitat Atòmica
u.e.	Unitat d'Electró
μ	massa electrònica fictícia

