



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

**IDENTIFICACIÓ DE SENSIBILITAT A L'HERBICIDA GLIFOSAT
A TRAVÉS DE *DOCKING* SOBRE L'ENZIM DIANA
5-ENOLPIRUVILSHIKIMAT-3-FOSFAT SINTASA**

Daniel Sánchez García

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA

Tutor acadèmic: Dr. Gerard Pujadas Anguiano, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, gerard.pujadas@urv.cat

En cooperació amb: Grup de recerca en Quimioinformàtica i Nutrició

Supervisor/s: Dr. Santi Garcia-Vallvé, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, santi.garcia-vallvé@urv.cat

Dr. Pere Puigbò Avalos, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, pedro.puigbo@urv.cat

Tarragona, 7 de juny 2021

Jo, Daniel Sánchez García, amb DNI 39930411-L, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 7 de Juny de 2021

A handwritten signature in black ink that reads "Daniel". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke underneath the name.

ÍNDIX

DADES DEL CENTRE	5
RESUM	6
INTRODUCCIÓ	7
1. Glifosat.....	7
1.1 Ús del glifosat	7
1.2 Mecanisme d'acció	8
1.3 Toxicitat i perfil ambiental del glifosat.....	8
2. Enzim 5-enolpiruvilshikimat-3-fosfat sintasa	12
2.1 Estructura i funció de l'enzim	14
2.2 Inhibició de l'enzim pel glifosat	17
3. Mecanismes moleculars de resistència al glifosat.....	18
3.1 Mecanismes de Resistència Sobre la Diana (MRSD)	18
4. Anàlisi de la sensibilitat al glifosat de l'enzim 5-enolpiruvilshikimat-3-fosfat sintasa ..	21
4.1 Classificació de l'enzim 5-enolpiruvilshikimat-3-fosfat sintasa	21
4.2 Anàlisi de la seqüència d'aminoàcids.....	21
4.3 <i>Docking</i> com a eina computacional per l'anàlisi de sensibilitat al glifosat..	23
HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS	26
METODOLOGIA	26
1. Preparació prèvia de les estructures proteiques amb UCSF Chimera i Avogadro	27
1.1 Eliminació de molècules no desitjades i contaminants.....	27
1.2 Minimització d'energia dels lligands.....	27
2. Superposició de les estructures proteiques amb Swiss PDB Viewer	28
3. Anàlisi de les estructures proteiques per <i>docking</i> amb AutoDock Vina	29

3.1	Preparació prèvia de l'estructura proteica	29
3.2	Determinació de la <i>grid box</i>	30
3.3	<i>Docking</i> de les estructures proteiques.....	31
RESULTATS I DISCUSSIÓ		32
1.	Resultats d'energia d'afinitat per <i>docking</i> segons classe	32
1.1	Anàlisi dels enzims avaluats.....	34
2.	Resultats d'energia d'afinitat segons sensibilitat al glifosat.....	38
CONCLUSIONS		41
AUTOAVALUACIÓ		43
BIBLIOGRAFIA.....		44
ANNEXOS		50

DADES DEL CENTRE

El Treball de Fi de Grau s'ha realitzat utilitzant la informació i els resultats obtinguts durant l'estada de pràctiques externes duta entre els mesos de febrer i maig de l'any 2021 al grup de recerca en Quimioinformàtica i Nutrició. Aquest grup de recerca pertany al Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili i està dirigit per en Dr. Gerard Pujadas i Anguiano i en Dr. Santi Garcia-Vallvé. L'objectiu del grup és utilitzar eines de disseny computacional, com són els mètodes de *docking* proteïna-l·ligand, juntament amb experimentació al laboratori per buscar nous compostos bioactius i demostrar les activitats predites. La investigació està dins del marc d'una col·laboració del Dr. Pere Puigbò (*Phylogenomics and Evolutionary Research group*) amb el laboratori *Helander-Saikkonen*, de la Universitat de Turku (Turku, Finlàndia). Aquest laboratori actualment està involucrat en investigacions focalitzades en diversos temes relacionats amb l'evolució i l'ecologia, com són l'estudi de les implicacions evolutives i ecològiques de la variació genètica, l'enriquiment d'espècies i la diversitat funcional de plantes, fongs i herbívors o l'estudi dels canvis en el rang de les espècies impulsat pel canvi climàtic. No obstant aquestes investigacions, una de les recerques més prometedores, en la qual he estat involucrat indirectament, és la identificació dels potencials efectes de l'ús excessiu de fertilitzants i pesticides en diversos ambients. L'investigador principal involucrat en aquest estudi és en Dr. Pere Puigbò que actualment forma part de l'equip investigador d'un projecte finançat per l'acadèmia de Finlàndia (Projecte No. 311077) per estudiar els efectes del glifosat en organismes no diana. El Dr. Puigbò, que també forma part de la Universitat Rovira i Virgili com a professor associat, treballa en l'àmbit de la biologia computacional i la genòmica microbiana. De manera que la investigació del glifosat i de les diferents classes de l'enzim EPSPS d'aquest herbicida duta a terme a través de la bioinformàtica, l'he realitzat amb el suport d'en Dr. Gerard Pujades, en Dr. Santi Garcia Vallvé i del grup de recerca de Quimioinformàtica i Nutrició i el Dr. Pere Puigbò en col·laboració amb el grup de recerca del laboratori *Helander-Saikkonen*.

RESUM

El Treball de Fi de Grau es basa en l'anàlisi computacional de les varietats existents en les seqüències de l'enzim *5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase* (EPSPS). L'enzim forma part de la via del shikimat, sent clau per la síntesi de tres aminoàcids aromàtics en plantes i microorganismes. La presència de l'enzim s'ha detectat en la microbiota de molts organismes, inicialment en les abelles i recentment en la microbiota intestinal humana. El glifosat és un herbicida utilitzat freqüentment a l'agricultura que pot interaccionar amb l'enzim inhibint la seva funció i que, per tant, la seva toxicitat a escala microbiana ha de ser considerada. L'objectiu principal d'aquesta investigació és poder distingir mitjançant programes de *docking* proteïna-lligand les variants d'aquest enzim conegudes com a sensibles i resistents al glifosat. L'estudi per *docking* de les possibles conformacions que pot adoptar el glifosat i que permeten la seva interacció amb residus del centre actiu de l'enzim pot permetre diferenciar si aquest és sensible o resistent a l'herbicida. Els resultats obtinguts en aquesta investigació demostren que és possible la distinció per zones dels enzims EPSPS, classificant-los com a potencialment sensibles o resistents a l'herbicida segons en la zona que es situï. No obstant això, s'observa que la distinció és problemàtica per una sobre-representació d'enzims mutants a la base de dades del *Protein Data Bank* (PDB). L'estudi i obtenció d'aquests resultats són un gran pas inicial en l'ús de *docking* per l'anàlisi de la sensibilitat al glifosat dels enzims EPSPS, obrint la porta a una metodologia nova i prometedora, però que encara està lluny del seu màxim potencial.

Paraules clau: glifosat; 5-enolpiruvilshikimat-3-fosfat sintasa; fosfoenolpiruvat; *docking* proteïna-lligand; resistència; sensibilitat.

Abreviacions:

EPSPS	5-enolpiruvilshikimat-3-fosfat sintasa	AMPA	Àcid aminometilfosfònic
GPJ	Glifosat	POEA	Polioxietil amina
PEP	Fosfoenolpiruvat	EPSP	5-enolpiruvil shikimat 3-fosfat
S3P	Shikimat-3-fosfat	Pi	Fosfat inorgànic

INTRODUCCIÓ

1. GLIFOSAT

La molècula N-(fosfometil) glicina, coneguda comunament amb el nom de glifosat o *RoundUp*, és un compost químic catalogat com a àcid fosfònic amb la fórmula química $C_3H_8NO_5P$. Aquesta molècula és globalment coneguda perquè s'utilitza com a herbicida gràcies a la seva alta capacitat i alt espectre per eliminar plantes no desitjades en camps de cultius (1,2). El glifosat és l'herbicida per excel·lència més utilitzat arreu del món, iniciant el seu ús en el sector agrícola durant l'any 1974 gràcies al descobriment de la seva activitat herbicida per part de l'empresa Monsanto. Tanmateix, el seu descobriment es remunta a l'any 1950, quan la molècula de N-(fosfometil) glicina va ser descoberta pel Dr. Henri Martin (1).

1.1 Ús del glifosat

Durant els seus inicis, per culpa de la seva capacitat no selectiva, aquest compost només podia ser utilitzat en condicions concretes. Per exemple, quan es pretenia eliminar tota classe de vegetació abans de dur a terme la plantació de cultius o quan es volia controlar el creixement de les plantes (3). No obstant això, el seu gran èxit comercial i el seu ús il·limitat es va assolir amb l'aparició dels cultius transgènics. Amb l'ús de l'enginyeria genètica, les primeres plantes modificades genèticament van arribar a l'agricultura, presentant tolerància o resistència a diversos herbicides, entre ells al glifosat. Des de la introducció de cultius resistents al glifosat, el seu ús ha augmentat exponencialment any rere any (4).

Als Estats Units, gairebé el 90 % dels cultius transgènics han sigut creats per tal d'adquirir resistència a aquest herbicida d'ampli espectre (5,6). Gràcies a aquest augment dels cultius genèticament modificats, l'ús del glifosat ha continuat augmentant fins a arribar a utilitzar-se 108,8 milions de kilograms de glifosat a l'any. Tots aquests aspectes, a més del preu assequible i l'efectivitat demostrada com a herbicida, causen que el glifosat sigui considerat l'herbicida més ideal fins ara (3).

1.2 Mecanisme d'acció

El glifosat actua a nivell de la via metabòlica del shikimat, inhibint l'enzim 5-enolpiruvilshikimat-3-fosfat sintasa (EPSPS) requerit per la biosíntesi d'aminoàcids aromàtics (fenilalanina, tirosina i triptòfan) (7). De forma més detallada, el glifosat competeix directament amb el substrat original de l'enzim, el fosfoenolpiruvat (PEP), per unir-se al seu lloc d'unió. A conseqüència de la unió del glifosat al lloc d'unió del substrat PEP, es produeix la inhibició de l'enzim i per tant la via metabòlica del shikimat és inhibida. La inhibició causa una reducció de la producció d'aminoàcids aromàtics, a més de provocar grans acumulacions de shikimat a la cèl·lula (8). El mecanisme d'acció del glifosat que confereix la capacitat d'inhibir el creixement de plantes no desitjades és un mecanisme únic, ja que és l'única molècula que s'ha comprovat experimentalment que pot inhibir aquest enzim. El glifosat no presenta cap molècula anàloga que produeixi aquesta inhibició, de manera que és considerat un excel·lent inhibidor de l'enzim EPSPS, fent que s'utilitzi de forma no selectiva com a herbicida (1,8).

1.3 Toxicitat i perfil ambiental del glifosat

A conseqüència de l'excessiu ús del glifosat com a herbicida en grans quantitats, el seu impacte mediambiental i la toxicitat són els principals problemes que presenta aquest herbicida, juntament amb l'increment abundant de plantes resistents (9).

La descomposició del glifosat és un paràmetre de certa rellevància perquè el principal metabòlit format a través del glifosat, l'àcid aminometilfosfònic (AMPA), pot resultar tòxic en altes quantitats. Aquest compost pot afectar a diversos graus en l'ecosistema en el qual es trobi, tal com succeeix amb el glifosat (10). La degradació de l'herbicida pot produir-se tant en les plantes ruixades per aquest compost com en els sòls en els quals existeixen gran varietat d'organismes capaços de produir la seva descomposició (3,5,9). El glifosat i els seus metabòlits es poden trobar en els sòls, en les plantes i fins i tot en els aliments, en els quals també s'han observat experimentalment aquests residus en una moderada concentració. Per aquest motiu, és important tenir en compte també els possibles efectes adversos crònics, tant del glifosat com del AMPA, el seu metabòlit primari. (3).

La presència d'adjuvants, que actuen com a surfactants, inclosos en herbicides s'ha de considerar per la seva possible toxicitat (11). Els surfactants són substàncies utilitzades conjuntament amb els herbicides amb l'objectiu d'incrementar l'absorció i la translocació d'aquests en les plantes. Alguns compostos que actuen com a surfactants, com són la polioxietil amina (POEA), poden resultar relativament tòxics segons l'organisme que els presenti, entre d'altres factors, augmentant així la toxicitat del glifosat (3,9).

A causa del constant i extens ús del glifosat que produeix la seva acumulació en l'ambient i la d'altres substàncies com metabòlits o adjuvants, han sorgit preocupacions sobre els efectes tòxics d'aquestes substàncies acumulades en el sòl, plantes, animals i microorganismes (9).

1.3.1 Efecte del glifosat en plantes

El glifosat és absorbit amb certa rapidesa a través de les diferents superfícies de les plantes. Quan aquest herbicida és ruixat a les plantes, és absorbit majoritàriament a través de difusió per les cutícules. Tot seguit, és translocat al floema en el qual es distribuirà de forma generalitzada, assolint inclús els teixits de creixement (1,12). El glifosat generalment no és eliminat, o és eliminat molt a poc a poc a través de la seva descomposició. Per aquest motiu, el glifosat actua molt lentament, permetent la seva expansió per tots els teixits de la planta abans que la fitotoxicitat limiti el seu moviment (8). S'ha evidenciat que el glifosat i els seus metabòlits són capaços d'inhibir l'activitat enzimàtica antioxidant i induir l'acumulació d'espècies reactives d'oxigen, causant danys cel·lulars (9). La planta afectada és poc probable que torni a créixer com a conseqüència de l'efecte del glifosat en els teixits de creixement i a la seva bona translocació i absorció per part de la planta (8). Experimentalment s'ha detectat que el glifosat pot augmentar el risc d'infeccions per patògens per culpa de l'absència de compostos aromàtics secundaris, com són les fitoalexines antimicrobianes que defenen les plantes contra patògens (13).

És important tenir en compte que l'ús continuat del glifosat any rere any pot comportar conseqüències com la tolerància o resistència a l'herbicida. La contínua evolució de la resistència al glifosat en plantes com a resultat d'aquesta massiva pressió de selecció creada pel constant ús del glifosat s'ha vist evidenciada per un augment elevat de casos de resistència (6). Amb l'objectiu d'eliminar aquestes plantes, l'ús del glifosat s'ha vist encara més augmentant, aplicant ràtios més altes d'aquesta substància i ruixant les plantes més contínuament (5).

1.3.1.1 Toxicitat a la microbiota de les plantes

Una relació indirecta entre el glifosat i els seus metabòlits i la microbiota de diverses espècies de plantes s'ha observat experimentalment. La microbiota de les plantes està composta per una immensa quantitat d'espècies diferents que venen determinades per l'espècie de la planta i el sòl en el qual aquesta planta es troba. Pel fet que existeixen diversos microorganismes que són sensibles al glifosat, la seva aplicació en plantes pot causar canvis en la microbiota d'aquesta i en la seva composició (9,13). Experimentalment, s'ha demostrat que aquests compostos produeixen variacions en les poblacions de la microbiota endofítica i de la rizosfera. Això demostra el clar impacte de l'aplicació de glifosat en la diversitat bacteriana que es troba en les arrels i la rizosfera de les plantes (13).

1.3.2 Efecte del glifosat en animals i humans

El glifosat és una molècula considerada neutra pels animals perquè aquests organismes no presenten la via metabòlica del shikimat, i en conseqüència, tampoc l'enzim diana del glifosat (EPSPS). Per aquest motiu, existeix una absència de toxicitat aguda del glifosat en animals com són els mamífers, rèptils i amfibis després d'una exposició a aquest herbicida. Per tant, encara que el glifosat s'utilitza en abundància, aquest conté molt baixa toxicitat cap als animals, més concretament cap als mamífers, presentant fins i tot una toxicitat aguda menor que la sal (1,8,9).

No obstant l'aparent seguretat del glifosat, la gran quantitat d'herbicida i metabòlits relacionats a aquest que s'acumulen a l'ambient poden causar toxicitat crònica severa en diferents nivells (9). Diversos estudis han establert certa correlació entre l'ús incrementat del glifosat i diverses malalties humanes com poden ser complicacions respiratòries (14) i danys renals (15) encara que a uns nivells baixos. Per altra banda, efectes adversos en el sistema reproductor d'animals de granja s'han evidenciat en presència de glifosat a determinades concentracions (16). De forma més concreta, en el cas dels humans, la seva exposició al glifosat s'ha de tenir en compte si és a grans concentracions. Tanmateix, avui en dia la majoria de productes amb glifosat no contenen altes concentracions d'aquest compost, de tal manera que el risc d'experimentar una exposició tòxica aguda és mínima (5).

1.3.2.1 Toxicitat a la microbiota de les abelles

La toxicitat del glifosat també s'ha evidenciat a la microbiota en alguns animals (17). La primera evidència va produir-se en les abelles, en les quals es va observar que l'exposició al glifosat produïa canvis significatius en la microbiota intestinal. Aquests canvis acaben afectant severament la salut de les abelles, reduint la seva efectivitat com a pol·linitzadores (18–20). La seva microbiota intestinal, com la de la majoria d'animals, presenta diverses funcions crucials com són el processament d'aliments, la regulació del sistema immune i la defensa contra patògens (19,21,22). Existeixen espècies microbianes residents en l'intestí de les abelles que presenten tolerància a altes concentracions de glifosat gràcies a la presència d'una variant de l'enzim EPSPS que és resistent a aquest compost. No obstant això, la gran majoria no presenten aquesta tolerància, fent que el glifosat afecti greument a la composició de la microbiota i produint que siguin més susceptibles a estressos ambientals (19). S'ha evidenciat que l'efecte d'altres concentracions de glifosat sobretot afecten a les abelles immadures, produint la seva mort (22). Altres estudis sobre la microbiota intestinal de les abelles també corroboren l'acció negativa del glifosat causant canvis en l'abundància de la majoria de les espècies bacterianes, com en *Snodgrassella alvi* (20,21). Per això es creu que l'ús massiu del glifosat a l'agricultura podria ser una de les raons del declivi de les poblacions d'abelles i altres insectes (23).

1.3.2.2 Toxicitat a la microbiota humana

El glifosat ha sigut considerat com un compost segur pels humans i per altres animals per la manca de la via metabòlica del shikimat d'aquests organismes (1). No obstant això, com ja s'ha esmentat, investigacions recents han descobert la presència de la via metabòlica en diversos microorganismes, molts d'ells sent part de la microbiota. En el cas dels humans, avui en dia existeixen estudis que tenen com a objectiu l'avaluació de l'impacte i l'efecte del glifosat en la microbiota humana de l'intestí. Un d'aquests, és l'estudi realitzat a la Universitat de Turku, en la qual s'han avaluat diversos enzims EPSPS provinents d'espècies de microorganismes diferents dels quals destaquen vuitanta residents en la microbiota humana (24). S'ha observat que gairebé un 54 % de les espècies avaluades presenten sensibilitat al glifosat, podent ser afectats per moderades i altes concentracions de glifosat. Els resultats suggereixen que l'efecte del glifosat pot produir canvis en la composició de la microbiota humana intestinal, reduint la seva diversitat. Això és perquè el glifosat afecta a una de les vies metabòliques essencials. Aquest percentatge correspon al 20 % del total d'espècies bacterianes que viuen a l'intestí (24).

2. ENZIM 5-ENOLPIRUVILSHIKIMAT-3-FOSFAT SINTASA

La via metabòlica del shikimat consta de set reaccions consecutives en les quals es produeix una transformació dels substrats inicials provinents del metabolisme del carboni, com són el fosfoenolpiruvat (PEP) i la D-eritrosa 4-fosfat (E4P), per a obtenir un compost anomenat àcid corísmic. Aquest compost és el precursor universal de tots els aminoàcids aromàtics (fenilalanina, tirosina i triptòfan), a més de diversos metabòlits derivats d'aquests (25) (Figura 1). La via metabòlica del shikimat és característica de les plantes, això no obstant, també s'ha trobat en altres organismes com bacteris, fongs i alguns protists. Respecte als animals, la via del shikimat no s'ha observat en aquests organismes (7).

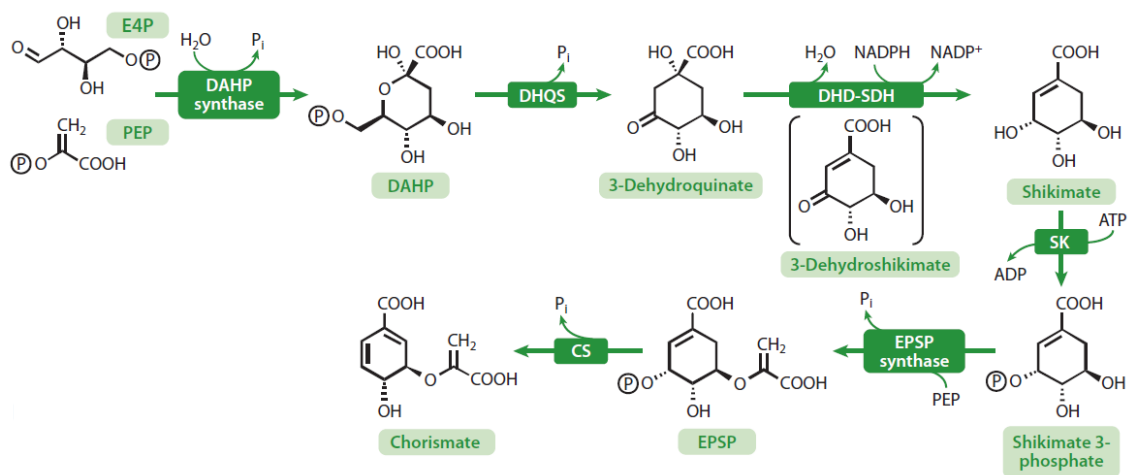


Figura 1. Esquema de les set reaccions de la via metabòlica del shikimat. Figura modificada de la referència (7).

La importància d'aquesta via recau en gran part en la producció del precursor dels aminoàcids aromàtics essencials fenilalanina, tirosina i triptòfan (26). Aquests aminoàcids aromàtics són molècules necessàries per a la biosíntesi de proteïnes en qualsevol organisme. La biosíntesi d'aquests aminoàcids, en alguns organismes, és possible gràcies a la via del shikimat (7). Altrament, la via també està involucrada en la síntesi de les vitamines K₁ i B₉ i l'hormona anomenada àcid salicílic que presenta funció de defensa en plantes (Figura 2) (7). Tanmateix, per culpa de la pèrdua evolutiva de la via del shikimat, els animals necessiten obtenir d'altres formes els productes que s'obtenen d'aquesta via, ja que són nutrients necessaris per a qualsevol cèl·lula. Per tant, en els animals es presenten altres vies alternatives per sintetitzar aquests nutrients encara que sobretot són incorporats a través de la dieta (26).

Identificació de sensibilitat a l'herbicida glifosat a través de docking sobre l'enzim diana 5-enolpiruvilshikimat-3-fosfat sintasa I Daniel Sánchez García

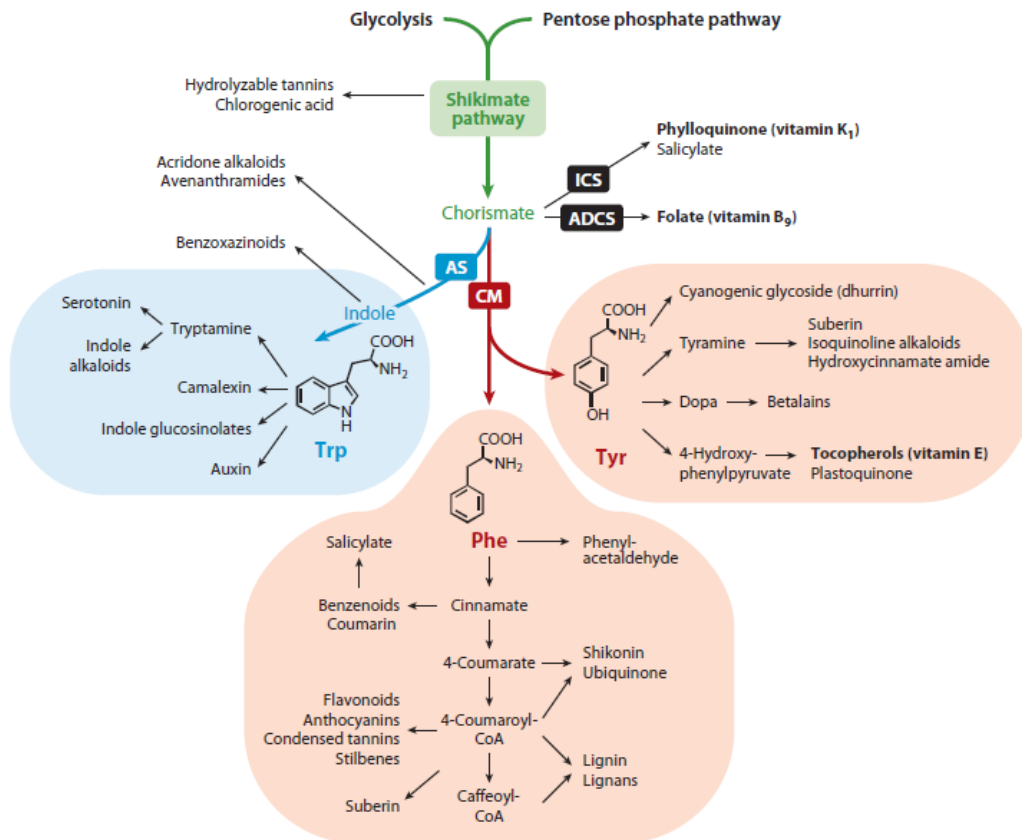


Figura 2. Esquema de les vies de síntesi dels aminoàcids aromàtics essencials i de vitamines relacionades amb la via del shikimat. L'àcid corísmic és un precursor utilitzat per les vies de síntesi dels aminoàcids aromàtics essencials i les proteïnes K₁ i B₉. Figura extreta de la referència (7).

L'enzim 5-enolpiruvilshikimat-3-fosfat sintasa (conegut com a EPSPS, EC 2.5.1.19) és un enzim de la família transferasa que actua en la via metabòlica del shikimat, catalitzant la sisena reacció de la via (25). La reacció és la transferència de la unitat enolpiruvil del fosfoenolpiruvat al 5-hidroxil del shikimat-3-fosfat (S3P) per produir el 5-enolpiruvilshikimat 3-fosfat (EPSP) i el fosfat inorgànic (Pi). Aquesta reacció es produeix mitjançant un intermediari tetraèdric format per S3P i un estat de carbocatió del substrat fosfoenolpiruvat, tot seguit de l'eliminació del fosfat inorgànic (7,27) (Figura 3).

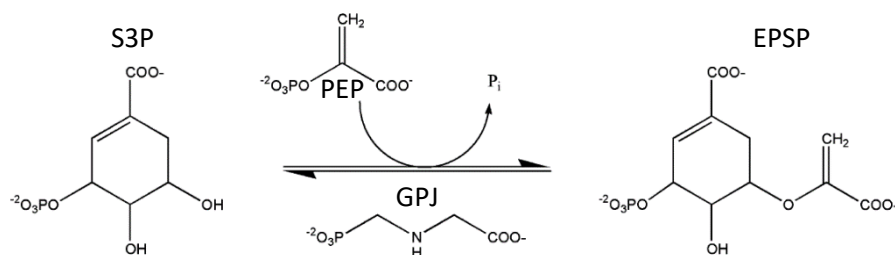


Figura 3. Reacció química catalitzada per l'enzim EPSP sintasa. Figura modificada de la referència (27).

2.1 Estructura i funció de l'enzim

Focalitzant en l'estructura enzimàtica de l'EPSPS, es destaca que és un enzim monomèric amb un pes molecular d'aproximadament 46.000 kDa. S'ha comprovat que aquesta proteïna està composta per dos dominis globulars diferents, cadascun format per 3 unitats de plegat idèntiques ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta$ -folding unit) (28) (Figura 4). Els dominis estan connectats per una doble cadena proteica anomenada *hinge* que permet l'aproximació d'ambdós dominis, actuant com a regió d'unió (27,29).

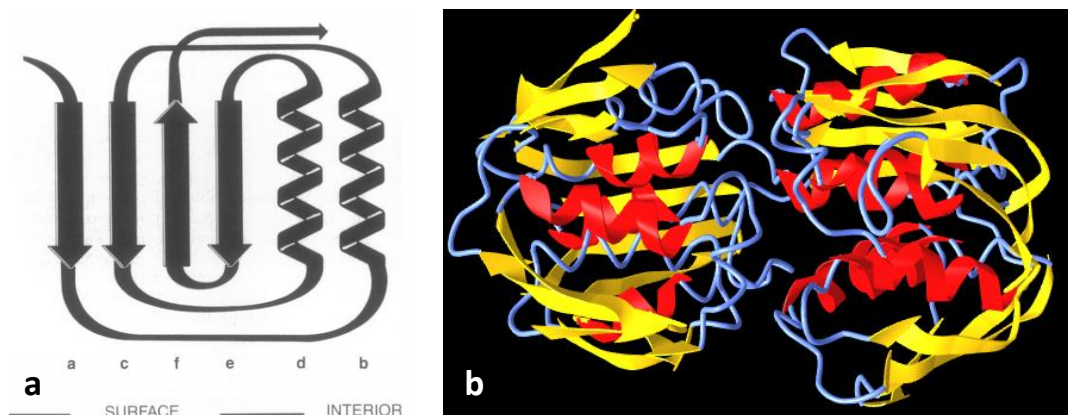


Figura 4. Visualització en 2D i 3D de l'enzim EPSPS (Estructura del PDB: 2AA9). (a) S'observa la topologia dels principals elements de l'estructura secundària de les unitats de plegat. Les lletres a-f determinen l'ordre d'aparició dels elements a través de la cadena. Figura extreta de la referència (28). (b) S'observa el primer i el segon domini de l'estructura proteica, ambdós compostos per 3 unitats de plegat idèntiques. En color groc s'observen les làmines beta. En color vermell s'observen les hèlixs alfa. En color blau s'observen els girs. Elaboració pròpia utilitzant el programa SwisPDBViewer i la pàgina web iCn3D Structure Viewer del NCBI.

2.1.1 Centre actiu

Respecte als residus que confereixen el centre actiu, s'ha evidenciat en *Escherichia coli* l'existència de diversos residus que són clau en la reacció que catalitza l'enzim. El principal residu és la Lisina de la posició 22 que actua com a base catalítica per desprotonar l'extrem 5-hidroxil del substrat S3P. La Glutamina de la posició 341 també destaca perquè actua com a àcid per protonar l'àtom C3 del substrat fosfoenolpiruvat. A més a més d'aquests residus, s'han determinat altres residus essencials a través de la mutació d'aquests per tal d'observar la disminució dràstica de l'activitat específica de l'enzim (30). La presència de residus estrictament conservats en el centre actiu dels enzims EPSPS és un fet gràcies a la seva importància catalítica. Els principals residus estrictament conservats que s'han identificat són Lisina 22, Serina 23, Arginina 27, Glicina 96, Arginina 124, Serina 169, Glutamina 171, Serina 197, Asparagina 313, Lisina 340, Glutàmic 341, Arginina 344 i Arginina 386 (29) (Figura 5).

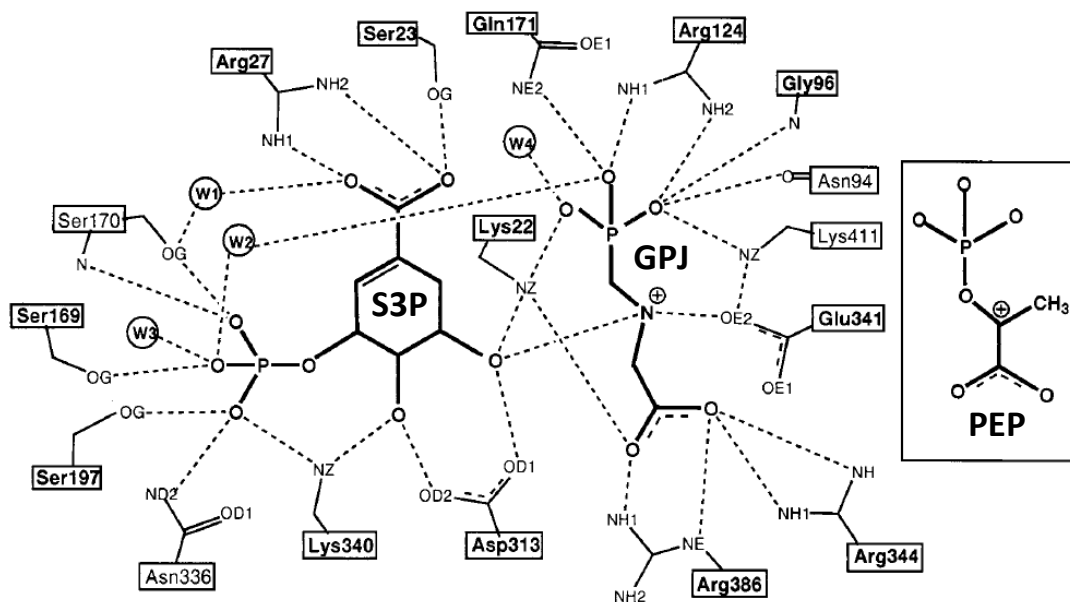


Figura 5. Representació del centre actiu de l'enzim EPSPS amb S3P i GPJ unit. Les etiquetes en negreta dels residus determinen els residus estrictament conservats del centre actiu. Les molècules en negreta integrades al centre actiu determinen el primer substrat de l'enzim (S3P) situat a la part esquerra i el glifosat (GPJ) situat a la part dreta. En el requadre de la dreta es troba el segon substrat de l'enzim (PEP). Figura modificada de la referència (29).

2.1.2 Canvi conformacional de l'enzim

Experimentalment en *E. coli* s'ha demostrat que l'enzim pateix un canvi conformacional un cop s'uneix al lloc d'unió el substrat S3P (29,31). D'entrada l'enzim es troba en una conformació oberta en la qual els dominis globulars proteics estan distants entre si. Després de la unió del substrat S3P es produeix el canvi conformacional, canviant la conformació oberta a una tancada en la qual els dominis globulars proteics se situen més pròxims entre si. Aquesta aproximació dona lloc a un ambient confinat i altament carregat que està immediatament adjacent al grup hidroxil del S3P i que és el lloc actiu d'unió del PEP (31). Per tant, el canvi conformacional produït per la unió del S3P provoca que el segon substrat de la reacció (PEP) es pugui unir al seu lloc d'unió corresponent en el centre actiu (29,32) (Figura 6).

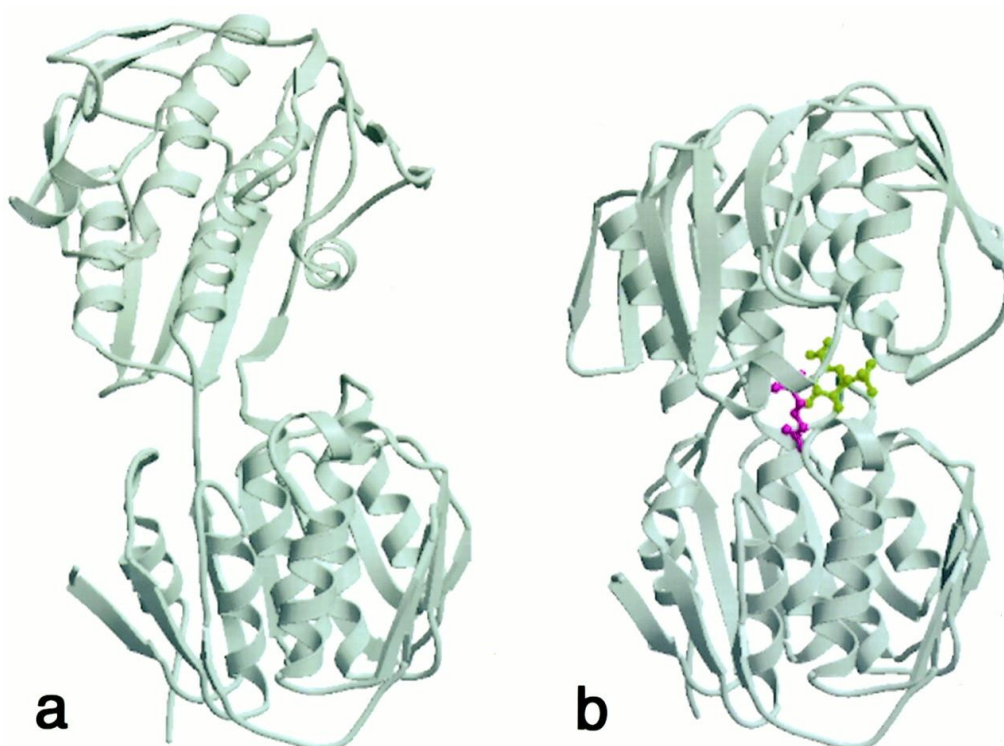


Figura 6. Representació cartoon de les dues conformacions de l'enzim EPSPS de l'espècie *E. coli*. (a) Conformació oberta (sense cap substrat unit). (b) Conformació tancada produïda per la unió del substrat S3P. En groc una molècula de substrat S3P unida. En magenta una molècula de glifosat unida. Figura extreta de la referència (29).

En un estudi de l'espècie *Streptococcus pneumoniae*, es planteja que el lloc d'unió del fosfoenolpiruvat només pot ser format per ambdós dominis, anomenats N i C terminal, quan aquests s'aproximen entre si pel canvi conformacional (33). La topologia general dels enzims EPSPS d'*E. coli* i *S. pneumoniae* és similar i en ambdós casos s'ha demostrat el canvi conformacional de l'enzim necessari per a dur a terme la reacció catalítica. Finalment es pot destacar que la unió del primer substrat (S3P) al seu lloc d'unió concorda amb el model d'acció enzimàtica anomenat *lock-and-key model*. El lloc d'unió és preservat al domini N-terminal sense importar la conformació de la proteïna (33). Aquest model suggereix que el substrat i el seu lloc d'unió presenten una total complementarietat de manera que es produeix una unió completa del substrat al lloc d'unió (34). Per altra banda, la unió del segon substrat (PEP) al seu lloc d'unió concorda amb el model anomenat *induced-fit model*. Això és perquè el lloc d'unió del segon substrat sorgeix del canvi conformacional induït per la unió del primer substrat i part d'aquest lloc d'unió és reorganitzat d'una forma induïda per acomodar al fosfoenolpiruvat per unir-se (33,34).

2.2 Inhibició de l'enzim pel glifosat

El glifosat és l'únic herbicida que pot inhibir l'enzim EPSPS (35). S'ha vist que les plantes transformades amb l'enzim EPSPS resistent al glifosat són 50 % més resistents al glifosat que les plantes no transformades. Això suggereix que l'enzim EPSPS és realment un lloc diana d'unió del glifosat (8). La inhibició causada per la unió del glifosat al centre actiu de l'enzim és una inhibició competitiva perquè la molècula d'herbicida competeix directament amb el lloc d'unió del substrat endogen (PEP) de l'enzim EPSPS (Figura 5). El glifosat forma un complex ternari estable i no covalent amb l'enzim i el primer substrat, causant la inhibició de l'enzim (36). L'any 2003 es va poder comprovar que el glifosat s'uneix en el mateix lloc d'unió que el substrat PEP, imitant un estat intermediari amb el S3P. Es va observar com els enllaços que es produïen quan el substrat PEP s'unia, també es produïen de forma idèntica quan el glifosat s'unia, establint-se interaccions similars (37). El glifosat i el fosfoenolpiruvat són molècules senzilles, curtes i de poca mida, compostes ambdós per un grup fosfat i un grup carboxil, presentant poques variacions estructurals entre si. És per aquest motiu que presenten una gran semblança en termes d'estructura química i càrrega (38,39) (Figura 7). No obstant això, el glifosat no ha de ser considerat un simple anàleg del fosfoenolpiruvat, ja que l'herbicida sembla imitar un estat intermediari del PEP en comptes de la seva estructura inicial (31). Per altra banda, el primer substrat de l'enzim EPSPS no competeix amb el glifosat per la unió al centre actiu. En aquest cas, no es dona aquesta inhibició competitiva que s'ha comprovat amb el segon substrat. No obstant això, aquest primer substrat S3P és essencial a l'hora d'unir-se el glifosat, ja que, si aquest no està unit prèviament, el glifosat no podrà unir-se al lloc d'unió del segon substrat (32,35).

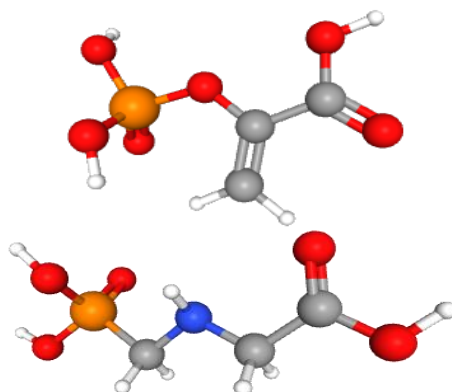


Figura 7. Estructures químiques en 3D del fosfoenolpiruvat (estructura superior) i del glifosat (estructura inferior). Els àtoms vermells simbolitzen àtoms d'oxigen; els grisos àtoms de Carboni; els taronges àtoms de fòsfor; els blaus àtoms de nitrogen; els blancs àtoms d'hidrogen. Figura extreta de la pàgina web PubChem de NCBI (38,39).

3. MECANISMES MOLECULARS DE RESISTÈNCIA AL GLIFOSAT

L'ús excessiu i en altes quantitats de glifosat any rere any ha causat l'aparició d'una forta i extensa pressió de selecció en les plantes afectades per l'herbicida (1). Aquesta pressió ha donat lloc a l'aparició, l'evolució i la selecció de resistència al glifosat en una abundant quantitat d'espècies de plantes (40). A més a més, tenint en compte la creació *in vitro* de plantes transgèniques resistents a l'herbicida a través de l'enginyeria genètica, és raonable l'aparició d'aquesta resistència generalitzada en molts tipus de plantes (41). La resistència al glifosat adquirida per les plantes prové d'un gran ventall de mecanismes involucrats entre si. Es planteja que l'acumulació dels diferents mecanismes de resistència ha provocat en certa manera l'augment dels nivells de resistència al glifosat en resposta a la contínua pressió de selecció de l'herbicida. La resistència al glifosat no només s'ha donat i observat en plantes. Aquesta resistència primer va ser detectada en bacteris els quals van adquirir mutacions en el gen de l'enzim EPSPS, causant que aquest presentés tolerància a l'herbicida (23).

Els mecanismes de resistència al glifosat que es troben en microorganismes, plantes i fongs poden ser classificats en Mecanismes de Resistència Sobre la Diana (MRSD), que actuen directament a nivell de l'enzim i Mecanismes de Resistència Fora la Diana (MRFD), que engloben mecanismes que permeten la reducció de la quantitat i ràtio d'acumulació del glifosat (42).

Dins del grup de mecanismes MRFD, existeix un gran ventall de mecanismes diferents que poden arribar a produir resistència al glifosat gràcies a la seva acció (23). Alguns exemples són els mecanismes de translocació que ocorren en plantes amb l'objectiu de produir l'exclusió del glifosat de forma física i la inhibició de l'absorció de l'herbicida (41). Un altre mecanisme és el segrest vacuolar amb el qual s'emmagatzema el glifosat al vacúol per evitar el seu efecte inhibidor (41). També existeixen mecanismes basats en la detoxificació del glifosat a través d'enzims capaços de degradar o transformar el glifosat, com la glifosat oxidasa (23,42).

3.1 Mecanismes de Resistència Sobre la Diana (MRSD)

Avui en dia s'han detectat diversos mecanismes MRSD que poden causar resistència al glifosat en plantes i microorganismes, sobretot en bacteris. Aquests mecanismes es basen en l'alteració de l'enzim EPSPS i principalment són l'amplificació gènica i les alteracions úniques o múltiples de nuclèotids del gen que codifica per l'enzim EPSPS (42).

L'amplificació gènica del gen de l'enzim EPSPS és un dels mecanismes capaç de produir resistència al glifosat. En haver-hi més còpies funcionals del gen, hi ha més quantitat d'enzim EPSPS, reduint així la probabilitat d'enzims afectats pel glifosat. Un cas similar és la sobreexpressió del gen que presenta el mateix efecte que l'amplificació gènica (23,43).

Les alteracions de nucleòtids que acaben afectant directament a la seqüència d'aminoàcids de l'enzim són un dels fenòmens més observats que han produït canvis en la sensibilitat de l'enzim al glifosat. És important tenir en compte que les mutacions que afecten la sensibilitat al glifosat, poden afectar també a l'afinitat d'unió del PEP, disminuint-la de forma dràstica. Això és perquè el glifosat s'uneix al mateix lloc d'unió que el fosfoenolpiruvat (31). Experimentalment, s'han observat diverses mutacions en l'enzim EPSPS que confereixen resistència al glifosat, incrementant el seu valor cinètic K_i de manera que es necessita més concentració de glifosat per unir-se a l'enzim i variant l'afinitat del fosfoenolpiruvat (variant el valor cinètic K_m) (31,40). Durant el transcurs dels anys s'han descobert mutacions de nucleòtids que causen canvis en la seqüència d'aminoàcids, variant residus concrets (44). Algunes de les mutacions que s'han pogut analitzar s'han relacionat amb variacions en la sensibilitat al glifosat (43). Així doncs, s'ha suggerit que la pressió per l'ús del glifosat pot provocar canvis de sensibilitat en la seqüència EPSPS dels microorganismes, en un curt termini evolutiu (45).

Un exemple és el cas de la mutació G96A, corresponent a la substitució de la Glicina en posició 96 per una Alanina (Gly96Ala). La substitució causa la presència d'un grup metil que causa impediments estèrics al lloc d'unió del glifosat, disminuint la seva afinitat pel glifosat (tot i que també disminueix l'afinitat pel PEP). Aquest mutant presenta una alta resistència al glifosat gràcies a aquest canvi, encara que disminueix dràsticament l'eficiència catalítica (27,31).

Unes altres mutacions de gran interès són les mutacions de la Prolina en posició 101 en *E.coli* (46) o la Prolina equivalent en plantes en posició 106 (44). Experimentalment, s'han avaluat diverses mutacions d'aquest residu amb l'objectiu d'observar canvis en la resistència al glifosat i l'afinitat d'unió del glifosat i el fosfoenolpiruvat. S'ha evidenciat que, encara que la prolina no interaccioni molecularment de forma directa amb el glifosat, la seva substitució per qualsevol altre residu causa canvis estructurals al centre actiu, produint una disminució de l'afinitat d'unió del glifosat (43). La substitució de la Prolina per la Leucina causa que l'afinitat d'unió dels substrats S3P i PEP es vegi alterada. No obstant això, aquesta substitució també afecta a la unió del glifosat, disminuint la seva afinitat també. En el cas de la substitució de la

Prolina per la Serina, l'afinitat d'unió dels substrats S3P i PEP no es veu gairebé afectada, mentre que l'afinitat del glifosat disminueix considerablement (46).

Uns dels casos més interessants són les mutacions dels residus Glicina i Prolina en la posició 100 i 105 per Alanina i Leucina respectivament, descobertes en una soca del gènere *Agrobacterium*. Els residus 100 i 105 d'aquest organisme corresponen amb els residus Glicina en posició 96 i Prolina en posició 101 de l'espècie *E. coli* (44). Aquest tret remarca la importància d'aquests residus respecte a la sensibilitat al glifosat. Aquests enzims són anomenats enzims CP4, ja que provenen de la soca anomenada CP4. La seva característica principal és que, gràcies a les substitucions produïdes en els residus concrets, la seva sensibilitat al glifosat disminueix en grans termes. La reducció de l'afinitat d'unió del glifosat ve donada perquè el residu Alanina 100 provoca que el glifosat s'uneixi únicament en una conformació condensada, d'alta energia i no inhibidora. Aquesta unió no produeix la inhibició de l'enzim, fent que l'enzim sigui resistent a aquest compost. Per altra banda, aquesta modificació estructural per la mutació no causa cap impediment estèric pel fosfoenolpiruvat que manté la seva afinitat d'unió (31,47).

En última instància es troben les múltiples mutacions que donen a lloc a variacions en més d'un residu (alteracions múltiples de nucleòtids). Les mutacions més destacades són les dels mutants anomenats TIPS, que presenten una doble mutació. La primera és la mutació T102I (substitució de la treonina 102 per una isoleucina) mentre que la segona és la mutació P106S (substitució de la prolina 106 per serina). Aquests dobles mutants no s'han trobat naturalment, sinó que han sigut creats per tal d'avaluar l'efecte combinatori d'aquestes dues mutacions. S'ha evidenciat que la doble mutació causa que el carboni alfa de la Glicina 96 presenti un canvi d'orientació cap al glifosat mentre que la cadena lateral de la lleucina 97 s'orienta fora del lloc d'unió del substrat. Això facilita la unió del fosfoenolpiruvat i disminueix el lloc d'unió pel glifosat. S'ha vist que només la doble mutació simultània de la Treonina 97 i la Prolina 101 proveeix els canvis conformacionals necessaris per aconseguir una resistència al glifosat i mantenir l'eficiència catalítica elevada (31,43,48). Per altra banda, s'ha observat que les mutacions per separat no presenten el mateix efecte en comparació a la doble mutació. En el cas de la substitució P101S, s'obté una certa tolerància al glifosat, mentre que en el cas de la substitució T97I, una sensibilitat al glifosat (48).

4. ANÀLISI DE LA SENSIBILITAT AL GLIFOSAT DE L'ENZIM 5-ENOLPIRUVILSHIKIMAT-3-FOSFAT SINTASA

4.1 Classificació de l'enzim 5-enolpiruvilshikimat-3-fosfat sintasa

A la natura s'han descobert diversos tipus d'enzims EPSPS que presenten variacions respecte a la seva sensibilitat potencial al glifosat. En alguns casos, trobant-se fins i tot enzims amb una elevada resistència, com són els enzims CP4 (31). Per això, s'han identificat dos tipus d'enzims segons la seva sensibilitat intrínseca al glifosat; (a) enzims sensibles al glifosat que són inhibits per baixes concentracions micromolars de glifosat i (b) enzims resistents al glifosat que són eficients catalíticament en presència d'altres concentracions de glifosat (31,47,48).

4.2 Anàlisi de la seqüència d'aminoàcids

La classificació actual dels enzims ESPSP comprèn quatre classes diferents d'aquests enzims. Aquesta classificació es basa en l'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids de cada enzim descobert. La diferenciació dels enzims per classes s'ha produït detectant la presència o absència d'aminoàcids marcadors al centre actiu i de motius concrets que determinen la classe de l'enzim (24). Com prèviament s'ha esmentat, existeixen diversos residus concrets que presenten una gran conservació evolutiva gràcies a la seva gran importància dins del centre catalític de l'enzim (29). Alguns d'aquests residus han sigut determinats com a residus marcadors, ja que la seva presència de forma conjunta és característica d'una de les classes (24,49). En general, els enzims de classe I es consideren potencialment sensibles i els enzims de classe II, III i IV es consideren potencialment resistents al glifosat. No obstant això, hi ha una gran proporció d'enzim EPSPS, sobretot en procarotes que no han pogut ser classificats en una de les quatre classes, quedant-se com a enzims no classificats (24).

Els enzims que pertanyen a la classe I són enzims naturalment sensibles al glifosat que han sigut descoberts en *Escherichia coli*, *Aeromonas salmocida*, *Petunia hybrida* i *Arabidopsis thaliana* (50). En estudis més recents, s'han pogut distingir dues subclasses dels enzims de classe I segons si l'enzim EPSPS prové d'un organisme de tipus eucariota/bacteri (classe I α) o archaea (classe I β) (49). La majoria d'organismes procarotes presenten enzims de classe I, essent sensibles al glifosat (aproximadament un 82 % en arquees i 57 % en bacteris) (24).

Els enzims de classe II són enzims que presenten alta tolerància pel glifosat. Aquests enzims han sigut descoberts en diverses espècies, entre elles en *Agrobacterium tumefaciens* (soca anomenada CP4) (31,47) i *Staphylococcus aureus* (51). Alguns enzims d'aquesta classe, en presentar de forma natural resistència al glifosat, han sigut utilitzats per crear plantes transgèniques.

Els enzims de classe III i IV són enzims considerats potencialment resistents al glifosat i són enzims relativament estranys a la natura, ja que corresponen a menys d'un 5 % de les seqüències d'enzims EPSPS (52). Els enzims de classe III només representen el 2 % i el 32 % d'espècies d'arquees i bacteris respectivament. En el cas dels enzims de classe IV, s'han observat que tots els enzims que s'engloben al grup pertanyen al fílum *Actinobacteria* (24).

Els residus i els motius marcadors utilitzats per tal de classificar els enzims EPSPS en les quatre possibles classes estan basats en les posicions dels residus de quatre seqüències de referència; una per cada classe. En el cas de la classe I α i I β la seqüència de referència és la de l'organisme *Vibrio cholerae* (vcEPSPS). La classe II presenta com a seqüència de referència l'organisme *Coxiella burnetii* (cbEPSPS). Per la classe III, la seqüència de referència és de l'organisme *Brevndimonas vesicularis* (bvEPSPS). Per últim, la classe IV té com a seqüència de referència l'organisme *Streptomyces davawensis* (sdEPSPS) (24). La metodologia emprada per tal de classificar mitjançant aquest mètode d'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids es basa en l'alineament de les quatre seqüències de referència respecte a la seqüència que es vol classificar. Es considera que la seqüència pertany a una de les quatre classes si aquesta presenta tots els aminoàcids marcadors de cada classe respecte a la seva seqüència de referència (24). En el cas de la classe III, no s'avalua la presència d'aminoàcids marcadors perquè aquesta classe es distingeix a través de la presència d'un dels possibles divuit motius en la seva estructura que serveixen com a marcadors (24). Els divuit motius es poden consultar a la patent referenciada (52).

4.2.1 Classificació d'enzims mutants

La classificació explicada anteriorment ha tingut una gran acceptació gràcies a la gran ajuda que aporta a l'hora de classificar adequadament els tipus d'enzims EPSPS de diferents organismes. Malgrat això, aquesta classificació s'ha d'utilitzar com a hipòtesi de treball de la potencial sensibilitat dels organismes al glifosat. Així doncs, existeixen enzims mutants que per

culpa d'un únic canvi de residu, la sensibilitat al glifosat es veu afectada, passant d'una sensibilitat elevada a una resistència a l'herbicida (27,31,47). Per exemple, el mutant G96A, esmentat anteriorment, pertany a la classe I segons els residus marcadors, i en conseqüència seria potencialment sensible al glifosat. No obstant això, el canvi de la glicina 96 per l'alanina causa que l'enzim sigui resistent a l'herbicida (27). A més a més, s'ha de tenir en compte que gran quantitat d'investigacions estan realitzant mutacions determinades o aleatòries en enzims de classe I per obtenir mutants amb tolerància o resistència al glifosat, com són els mutants de l'espècie *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* (53). Un exemple és el cas dels mutants anomenats TIPS que, gràcies a una doble mutació, es produeix una disminució excessiva de la sensibilitat al glifosat (48). Aquest fet provoca que hi hagi alguns mutants artificials de l'EPSPS que van en sentit oposat a la seva classificació de sensibilitat potencial. En altres paraules, existeixen enzims de classe I que poden ser resistents al glifosat i enzims de classe II que poden esdevenir sensibles a través de mutacions en residus no marcadors. La sobre-representació d'enzims mutants a la base de dades del PDB provoquen dificultats en l'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids que han de ser corregides manualment a partir de cerques a la literatura científica.

4.3 Docking com a eina computacional per l'anàlisi de sensibilitat al glifosat

L'eina molecular anomenada *docking* és un mètode computacional de modelatge molecular que és utilitzada per predir l'estructura tridimensional d'un complex no covalent entre una proteïna i un possible lligand d'aquesta, així com la seva afinitat per unir-se (54,55). El *docking* a través d'algoritmes prediu les possibles interaccions que poden ocórrer entre les molècules, calculant les energies d'unió, essent de gran ajuda per l'anàlisi de proteïnes i lligands. Avui en dia, és àmpliament utilitzat per l'estudi d'interaccions biomoleculares i per conèixer els seus mecanismes, tenint en compte que és un mètode ràpid i d'alta fiabilitat (56).

Per obtenir les conformacions predites amb més probabilitat d'unió per *docking* són requerits dos processos principals: (a) la cerca de conformacions espacials que representen diversos modes d'unions potencials i (b) la predicció de les energies d'interacció associades a cada una de les conformacions d'unió predites. Els programes de *docking* executen aquests dos processos a través d'un procés en els quals cada conformació del lligand és avaluada per diverses funcions de puntuació. Aquest procés és repetit de forma recursiva fins a trobar una solució de mínima energia la qual és predita com la conformació més estable per unir-se (54).

El primer procés que es produeix als programes de *docking* molecular és anomenat cerca conformacional. Durant aquest procés els paràmetres estructurals del lligand, com els graus de llibertat que depenen de la quantitat d'enllaços rotables, són modificats per tal de trobar conformacions a través d'algoritmes que apliquen mètodes sistemàtics o estocàstics (54). Per una banda, els mètodes sistemàtics promouen variacions lleugeres en els paràmetres estructurals esmentats, canviant la conformació del lligand gradualment mentre disminueix l'energia fins a assolir una solució de mínima d'energia. Per tant, l'algoritme determina l'energia d'afinitat de les conformacions fins a trobar la solució de menor energia. La principal limitació d'aquest mètode és que pot determinar com a solució final una solució d'energia mínima local en comptes d'una solució d'energia mínima global (54,57). Per altra banda, els mètodes estocàstics es basen en la modificació a l'atzar dels paràmetres estructurals del lligand. L'algoritme genera conformacions moleculars a l'atzar de forma contínua fins que s'assoleix el mínim global d'energia. Aquest mètode disminueix la probabilitat de determinar una solució d'energia mínima local com a solució final. No obstant el gran problema del mètode és el gran cost computacional associat a la generació atzarosa de les conformacions (54).

El segon procés és l'avaluació de les energies d'unió de cada conformació. Els programes de *docking* utilitzen funcions de puntuació amb l'objectiu d'estimar les energies d'interacció intermolecular de les conformacions predites (55,57). La variació de l'energia de les conformacions ve determinada segons l'energia lliure de Gibbs, és a dir, la suma d'interaccions intermoleculars que té en compte els canvis d'entropia i entalpia del lligand i la macromolècula per separat i quan estan en conjunt. Com més negatiu és el valor d'energia lliure de Gibbs, major afinitat d'unió presenta el lligand (54). Les diverses conformacions generades durant el procés, són avaluades a través de les funcions de puntuació que assignen una puntuació determinada a cada conformació (55). Les prediccions de l'energia d'unió es produeixen a través de l'avaluació dels fenòmens físics i químics involucrats en la unió del lligand i el receptor, com són interaccions intermoleculars i efectes entròpics. Per tant, com més paràmetres fisicoquímics són avaluats, major precisió de les funcions de puntuació (54).

Les funcions de puntuació utilitzades per tal de determinar l'energia d'afinitat de les conformacions es classifiquen en tres grups: (a) funcions basades en el camp de força, (b) funcions empíriques i (c) funcions basades en el coneixement (55,58). Les funcions de puntuació basades en el camp de força estimen l'energia d'unió a través de la suma de les interaccions

enllaçants i no enllaçants. Aquestes interaccions venen determinades per diversos paràmetres com són la distància entre enllaços i els angles en el primer cas o considerant les interaccions electroestàtiques i de Van der Waals en el segon cas (54,55). Les funcions empíriques descriuen els esdeveniments físics involucrats en la formació del complex lligand-receptor com són els ponts d'hidrogen, interaccions iònics o efectes entròpics. La descripció d'aquests esdeveniments es produeix a través d'una base de dades de la qual s'extreu aquesta informació. Per tant, es parteix de complexos amb energies d'afinitat conegudes. Es realitzen models de regressió a partir d'aquestes dades amb l'objectiu de calcular l'energia d'afinitat per interpolació (54,55,58). Les funcions basades en el coneixement generen la mitjana de totes les distàncies dels àtoms en interaccions conegudes amb anterioritat per a usar-les com a referència per a generar prediccions de les energies d'afinitat a través d'interpolació. Els diferents programes de *docking* utilitzen aquestes funcions amb l'objectiu d'avaluar les energies d'unió (54,55).

AutoDock Vina és un programa computacional gratuït de *docking* desenvolupat per Trott i Olson que permet obtenir de forma ràpida i precisa models predictius d'unió d'un lligand a una macromolècula (57). Aquest programa incorpora algorismes genètics que es basen en el mètode de cerca estocàstic per tal de generar diverses conformacions possibles amb una energia mínima. Els algorismes genètics incorporen els conceptes de la teoria de l'evolució i la selecció natural per disminuir l'alt cost computacional que causa l'ús del mètode estocàstic. La disminució es produeix a través de la selecció de les conformacions de menor energia per a generar noves conformacions i aquestes tornar a ser seleccionades seguint el mateix criteri (54). Finalment, després de diversos cicles de cerca i avaluació de conformacions, es troba la conformació corresponent al mínim global d'energia. En el cas d'AutoDock Vina, s'utilitzen les funcions basades en el camp de força i les funcions empíriques per tal d'avaluar l'energia d'afinitat (59,60). Per tant, el programa prediu (amb major o menor precisió) l'estructura 3D dels complexos proteïna/ligand amb més afinitat (57). Els resultats que s'obtenen a través d'aquest programa són els valors de les energies d'afinitat de les nou conformacions predites del lligand que són predites com a més estables, considerant l'estructura proteica com a una estructura rígida. Com més negatiu és el valor, la conformació predita presenta una major estabilitat i afinitat d'unió a la macromolècula (57).

HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

El mètode d'anàlisi dels enzims EPSPS basat en la detecció de residus marcadors de classe presenta diverses limitacions en algunes ocasions a l'hora de classificar els enzims, com el cas de les seqüències que no pertanyen a cap classe establerta. Avui en dia, no s'ha realitzat encara cap investigació que presenti l'anàlisi per *docking* com a eina per predir la sensibilitat al glifosat dels enzims EPSPS. La hipòtesi que es planteja en aquest treball és la determinació de la classe dels enzims mitjançant l'anàlisi de les possibles interaccions del lligand i el glifosat amb els residus del centre actiu de l'enzim amb l'ajuda de programes de *Docking* proteïna-ligand.

Amb l'objectiu d'avaluar la hipòtesi plantejada, s'utilitzarà AutoDock Vina per tal d'establir una distinció clara dels diversos enzims 5-enolpiruvilshikimat-3-fosfat sintasa basada en la sensibilitat o la resistència de l'enzim respecte al glifosat. Per aquest motiu l'objectiu principal que es vol assolir és la distinció de la sensibilitat o resistència d'enzims EPSPS a través d'un criteri establert per l'anàlisi *docking* proteïna-ligand.

Actualment encara existeixen un gran ventall de seqüències d'enzims EPSPS que no s'han pogut classificar o que potser pertanyen a altres grups no descoberts fins ara. Amb l'eina computacional del *docking*, es busca establir noves classes d'enzims EPSPS i, alhora, poder classificar enzims no classificats a través de l'anàlisi dels residus marcadors. Per aquest motiu, un dels objectius secundaris a llarg termini és el descobriment d'altres classes d'enzims i la classificació d'enzims que no estaven prèviament classificats a través d'aquest nou mètode.

METODOLOGIA

La metodologia emprada en aquesta investigació ha sigut dissenyada amb l'objectiu de poder discriminar els enzims EPSPS segons la seva potencial sensibilitat al glifosat, distingint els resistents dels sensibles a l'herbicida.

La idea general d'aquesta metodologia és l'ús de l'anàlisi per *docking*, tant del glifosat com del fosfoenolpiruvat (substrat de l'enzim EPSPS), amb diverses estructures d'enzims EPSPS ja classificats segons els residus marcadors de classe. L'objectiu és obtenir resultats d'energia d'afinitat d'aquests lligands. Es creu que els resultats d'energia d'afinitat d'unió de cada enzim poden determinar la capacitat de l'enzim analitzat de presentar resistència al glifosat.

Els enzims seleccionats per ser analitzats per *docking* són enzims que presenten una estructura a la base de dades del *Protein Data Bank* (PDB) i es troben ja classificats segons la seva seqüència d'aminoàcids a través dels residus marcadors de cada classe (les estructures es poden trobar a <https://ppuigbo.me/programs/EPSPSClass/>). Dels enzims ja classificats del PDB s'han escollit els enzims que pertanyen a les classes I i II perquè aquests són els enzims més comuns i no presenten tantes complicacions a l'hora d'analitzar-los. Per altra banda, un altre requisit dels enzims seleccionats han sigut la seva cristal·lització amb S3P. És essencial recordar que només els enzims en els quals prèviament s'ha unit el substrat S3P al seu lloc d'unió, presenten la conformació necessària perquè el segon substrat (PEP) o el glifosat s'uneixi. Tenint en compte aquests paràmetres necessaris, s'han acabat escollint 20 estructures del PDB que s'han pogut analitzar. Els codis del PDB d'aquests enzims analitzats són: classe I (2AAY, 2AA9, 1MI4, 1G6T, 1G6S, 3FK1, 3FK0, 2QFS, 2QFU, 3FJZ, 3FJX, 2QFT, 2QFQ, 3NVS) i classe II (2GGA, 2GG6, 2GGD, 3SLH, 4ZND, 1RF6).

1. PREPARACIÓ PRÈVIA DE LES ESTRUCTURES PROTEIQUES AMB UCSF CHIMERA I AVOGADRO

1.1 Eliminació de molècules no desitjades i contaminants

El primer pas per tal de preparar les estructures proteiques per l'anàlisi per *docking* és l'eliminació de qualsevol molècula no desitjada o contaminant que pugui interferir o interaccionar en l'anàlisi. Un exemple són els ions fosfat que poden estar disposats al lloc d'unió del substrat PEP al centre actiu, produint que el lligand no s'hi pugui unir correctament. El programa UCSF Chimera permet l'eliminació d'aquestes molècules d'una forma idònia i ràpida. L'estructura que s'obté al final és només l'estructura proteica de l'enzim juntament amb el substrat S3P unit al centre actiu. Aquest procediment es va repetir per cada una de les vint estructures proteiques analitzades.

1.2 Minimització d'energia dels lligands

Un dels aspectes que s'han de tenir en compte és la minimització d'energia de les molècules que volen ser analitzades per *docking* per unir-se a l'enzim, en aquest cas, el glifosat i el fosfoenolpiruvat. Avogadro és un programa d'edició i visualització molecular que permet

establir els angles i les distàncies dels enllaços entre àtoms d'una forma correcta, obtenint-se així l'estructura tridimensional adequada. Aquest programa té en compte les forces intramoleculares necessàries per garantir un bon resultat. A través de la pàgina web PubChem, base de dades que conté informació de gairebé totes les estructures químiques existents, es va realitzar la descàrrega de les estructures corresponents al glifosat i el fosfoenolpiruvat en dues dimensions. Finalment, mitjançant el programa Avogadro, es van realitzar els ajustaments necessaris respecte als angles i les distàncies dels enllaços entre els àtoms de cada molècula per obtenir les estructures en tres dimensions amb l'energia minimitzada.

2. SUPERPOSICIÓ DE LES ESTRUCTURES PROTEIQUES AMB SWISS PDB VIEWER

La superposició de totes les estructures proteiques que es volen analitzar és un pas clau en la investigació per *docking*. S'ha de tenir en compte que cadascuna de les estructures descarregades del PDB presenten orientacions de les seves coordenades que poden ser del tot diferents. Per tant, per realitzar el *docking*, és necessari que estiguin totes superposades amb la mateixa posició i coordenades per tal de poder fer comparacions entre els resultats de forma més còmoda.

La *grid box* es defineix com l'espai tridimensional de la proteïna que l'usuari delimita per a realitzar el *docking* (57). Usualment la *grid box* ve determinada pel centre actiu, fent que aquest espai ocupi tot el volum del centre actiu. En aquest espai és on el programa AutoDock Vina cerca solucions de possibles conformacions que pot adoptar el glifosat per unir-se a l'estructura proteica seleccionada. Aquest paràmetre s'ha d'establir manualment per realitzar un *docking* i sempre dependrà de l'objectiu del *docking* i de la posició de l'estructura a analitzar. El fet que les estructures estiguin superposades fa que a través d'uns paràmetres comuns, com és la definició d'unes dimensions i una posició universal de la *grid box* (Figura 8), es puguin analitzar de la mateixa forma tots els enzims i es puguin comparar adequadament. En el cas que no estiguessin superposades, els paràmetres de la *grid box* s'haurien d'ajustar per cada estructura, causant una variació que impossibilita la posterior comparació dels resultats i la seva validesa.

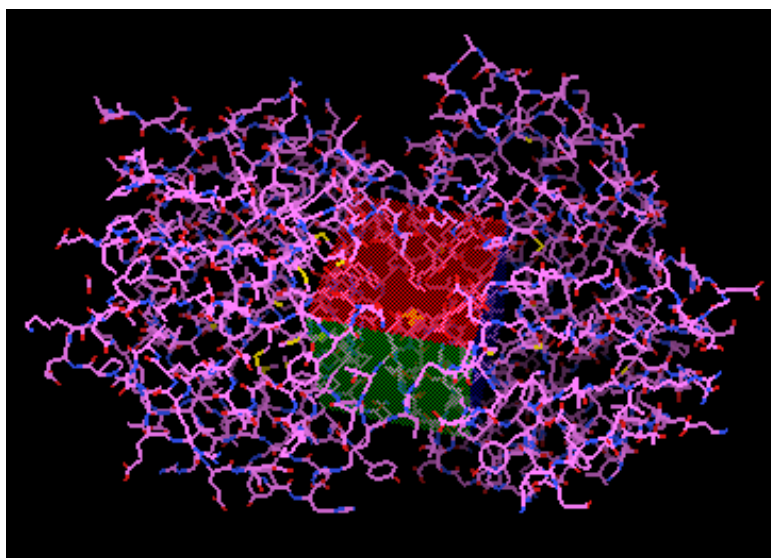


Figura 8. Visualització de la grid box establerta per l'anàlisi de les estructures seleccionades del PDB de l'enzim EPSPS. L'enzim de referència (2AAY) està visualitzat amb la representació filferro. La grid box està situada al centre actiu (cada dimensió està representada amb un color). Elaboració pròpia amb el programa AutoDock Vina.

El programa SPDB Viewer s'ha utilitzat per a superposar les 20 estructures proteiques abans de realitzar el *docking*. En el cas d'aquesta investigació, es va definir arbitràriament l'estructura proteica 2AAY com a estructura de referència i, per tant, les dinou restants es van superposar a aquesta. Després de la superposició, es van guardar de forma individual les estructures. D'aquesta forma, es van obtenir 20 estructures proteiques situades amb idèntica orientació.

3. ANÀLISI DE LES ESTRUCTURES PROTEIQUES PER DOCKING AMB AUTODOCK VINA

3.1 Preparació prèvia de l'estructura proteica

Abans de realitzar el *docking*, és necessari preparar l'estructura proteica perquè el *docking* es produeixi d'una forma adequada. Un d'aquests processos necessaris és l'addició dels hidrògens polars en l'estructura proteica i l'addició de les càrregues de Kollman. L'ús de l'AutoDock Vina produeix l'avantatge de no haver de determinar més paràmetres com per exemple l'addició d'altres tipus de càrregues, ja que el mateix programa està optimitzant per determinar-los de forma automàtica. Cada una de les vint estructures a analitzar ha sigut preparada tal com s'ha esmentat.

3.2 Determinació de la *grid box*

Per determinar les dimensions de la *grid box* i el seu centre s'ha utilitzat com a referència l'estructura 2AAY del PDB d'*E. coli* que presenta glifosat ja unit al lloc corresponent. L'elecció de l'ús d'aquesta estructura proteica com a referència per la *grid box* és perquè ha de concordar amb l'estructura utilitzada per dur a terme la superposició de totes les altres proteïnes. És de gran importància delimitar les dimensions de la *grid box* perquè és on es realitzarà el *docking*. Una mida excessiva de la *grid box* podria produir que el glifosat s'unís de forma no específica al lloc d'unió del fosfoenolpiruvat, mentre que una mida molt reduïda d'aquesta causarà que el glifosat no pugui unir-se al lloc d'unió. Per aquest motiu, és vital poder determinar les dimensions adequades de la *grid box* en els tres eixos.

3.2.1 Coordenades del centre de la *grid box*

Per a calcular les coordenades exactes del centre de la *grid box* es va utilitzar com a referència el glifosat unit de l'estructura del PDB 2AAY, corresponent a l'enzim EPSPS d'*E. coli*. Concretament es va calcular la mitjana de cada una de les coordenades de cada àtom per extreure un punt concret amb les coordenades dels tres eixos (x,y,z). Les coordenades cada àtom de glifosat de l'estructura 2AAY van ser obtingudes a través de la base de dades del PDB. Les coordenades resultant del centre de la *grid* són $X = 60,4261 \text{ \AA}$; $Y = 8,8258 \text{ \AA}$; $Z = 29,0024 \text{ \AA}$ (Annex 1).

3.2.2 Dimensions de la *grid box*

Respecte a les dimensions en els tres eixos de la *grid box*, s'han utilitzat els residus que conformen el centre actiu de l'enzim EPSPS per determinar-les. Bibliogràficament, el centre actiu de l'enzim EPSPS ha sigut descrit en diverses ocasions a través de la investigació dels residus evolutivament conservats i observar el mecanisme molecular pel qual es dona la reacció catalítica (29,30). En aquest cas, s'han utilitzat els residus corresponents definits com a part del centre actiu de l'estructura 2AAY per tal de delimitar les dimensions. D'aquesta forma es garanteix que la *grid box* presenta la mida ideal perquè tots els residus del centre actiu estiguin incorporats en aquesta. Les dimensions establertes de la *grid* són de 15,0 per cada eix ($X = 15,0 \text{ \AA}$; $Y = 15,0 \text{ \AA}$; $Z = 15,0 \text{ \AA}$).

Les dimensions de la *grid box* acordades es van verificar experimentalment a través de l'AutoDock Vina. Es van establir unes dimensions de la *grid box* superiors a les acordades per tal d'anar reduint-les una unitat per cada *docking* amb l'objectiu d'arribar a uns resultats esperables. Es van utilitzar estructures corresponents a la classe II per a ser avaluades per *docking* tant pel glifosat com pel fosfoenolpiruvat, ja que corresponen a enzims resistents al glifosat. En aquestes estructures el fosfoenolpiruvat és capaç d'unir-se amb alta afinitat mentre que el glifosat no. De manera que, reduint cada cop més les dimensions, es va arribar a un punt en el qual les dimensions eren les idònies perquè els resultats de *docking* eren concordes amb el fonament teòric. Es podria evidenciar de manera senzilla si les dimensions de la *grid box* es disminueixen massa, ja que ni el glifosat ni el fosfoenolpiruvat podrien unir-se, obtenint-se resultats no esperables per *docking*.

3.3 Docking de les estructures proteiques

El *docking* es va realitzar de forma individual per cada una de les estructures de l'enzim EPSPS seleccionades amb anterioritat, utilitzant en cada cas l'arxiu de l'estructura superposada. És important utilitzar aquest arxiu que presenta l'estructura superposada, ja que la *grid box* s'ha definit a partir d'aquesta posició concreta. El *docking* es va realitzar utilitzant glifosat com a lligand i tot seguit fosfoenolpiruvat. Per cada enzim analitzat i cada lligand es van realitzar deu repeticions del *docking*, obtenint nou possibles conformacions per cada repetició. Per tant, per cada enzim s'obtenien vint resultats de *docking* i cent vuitanta conformacions (90 pel glifosat i 90 del fosfoenolpiruvat).

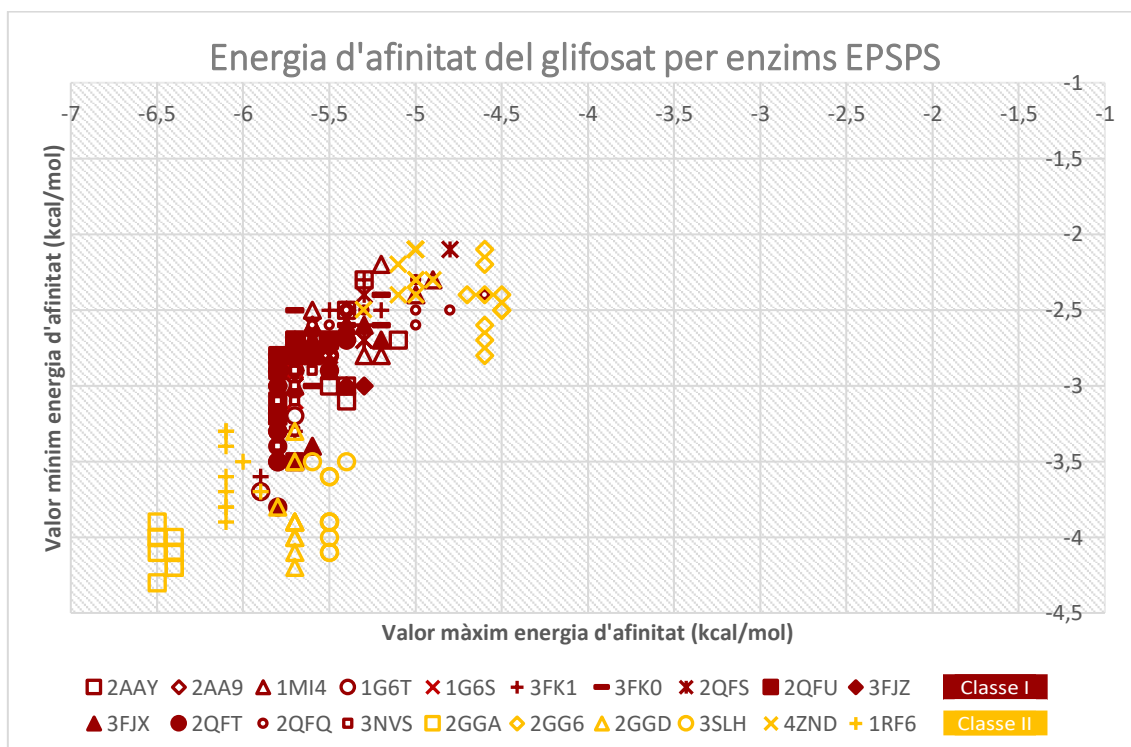
Els resultats obtinguts de cada *docking* realitzat es van recopilar en un full d'Excel en el qual es van anotar només les conformacions amb més i menys energia d'afinitat. Per tant, de cada *docking* s'obtenen el valor mínim i el valor màxim d'energia d'afinitat (Annex 2). A més a més dels dos resultats d'energia d'afinitat de cada repetició, s'han calculat les ràtios d'afinitat glifosat/fosfoenolpiruvat respecte u per ambdós tipus d'enzims (classe I i classe II). L'objectiu de les ràtios d'afinitat glifosat/fosfoenolpiruvat és poder observar la tendència general de cada enzim respecte a la seva sensibilitat al glifosat (Annex 2).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els gràfics que es veuran a continuació han sigut extrets a través dels resultats obtinguts per *docking* de cada estructura proteica que es poden trobar recopilats a l'Annex 2.

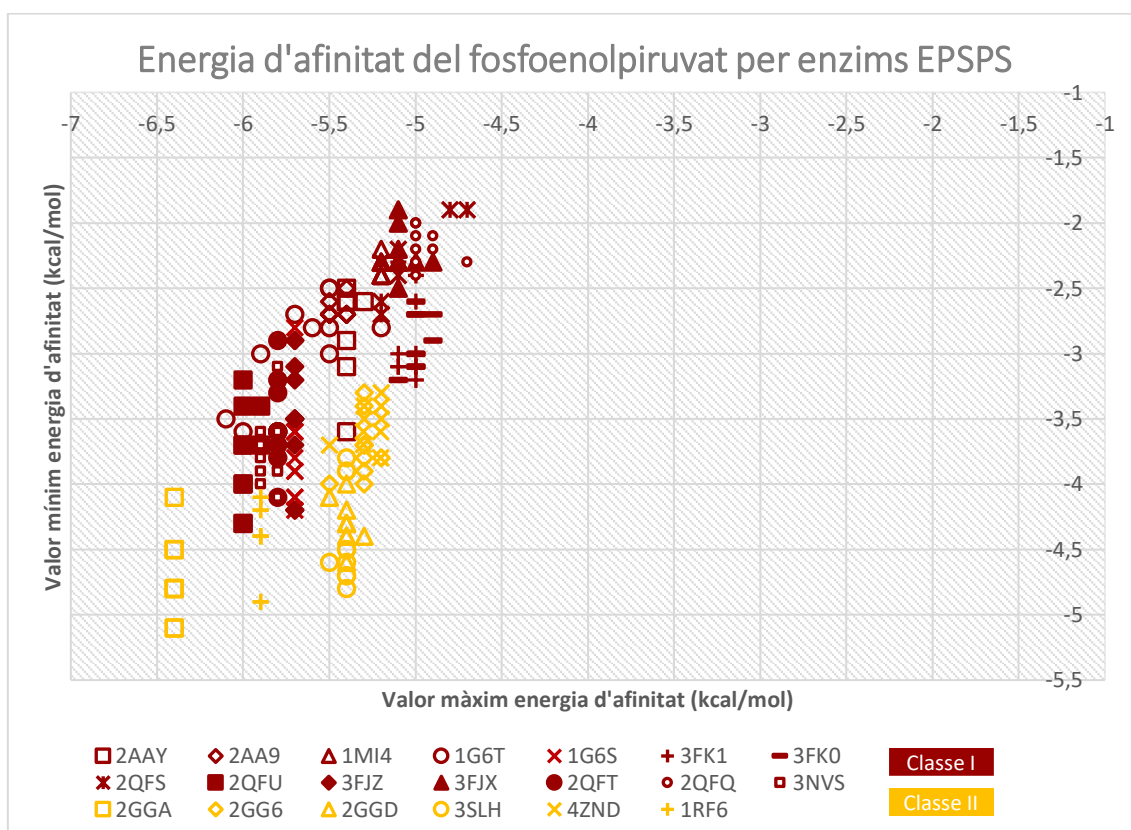
1. RESULTATS D'ENERGIA D'AFINITAT PER *DOCKING* SEGONS CLASSE

Els resultats d'energia d'afinitat dels lligands avaluats, el glifosat i el fosfoenolpiruvat, pels diversos enzims EPSPS que s'han obtingut per *docking* s'han representat en un gràfic de dispersió. Els gràfics s'han separat segons el tipus de substrat analitzat, obtenint-se un gràfic pel glifosat (Gràfic 1) i un altre pel fosfoenolpiruvat (Gràfic 2) que contenen els valors d'energia d'afinitat per cada un dels vint enzims analitzats. En l'eix de les abscisses es representa el valor màxim d'energia d'afinitat (kcal/mol) i en l'eix de les ordenades es representa el valor mínim d'energia d'afinitat (kcal/mol) per cada resultat de *docking* realitzat. Les dues classes d'enzims, classe I (potencialment sensible al glifosat) i classe II (potencialment resistent al glifosat), es diferencien segons el color dels marcadors; sent vermell per la primera classe i groc per la segona. Cada enzim avaluat presenta un marcador únic que permet la seva distinció al gràfic.



Gràfic 1. Representació gràfica de l'energia d'afinitat del glifosat per diversos enzims EPSPS. En color vermell es representen els enzims corresponents a la classe I. En color groc es representen els enzims corresponents a la classe II. Cada enzim està representat amb un marcador distingible i presenta 10 repeticions representades. Elaboració pròpia.

Analizant el gràfic obtingut pel primer lligand avaluat, el glifosat, es pot deduir que no hi ha una distribució uniforme entre ambdues classes d'enzims, obtenint-se dues zones diferenciades en les quals els enzims de classe II se separen. Tenint en compte el fonament teòric el qual detalla que els enzims de classe II presenten resistència al glifosat i, per tant, aquest lligand no té la capacitat d'unir-se amb una alta afinitat a l'enzim (46,47), els resultats obtinguts no són concordants. Els enzims de classe II, amb codi del PDB 2GGA, 1RF6 i 3SLH, presenten inclús una major afinitat d'unió del glifosat que els enzims de classe I, que són potencialment sensibles. Per altra banda, prestant atenció als enzims pertanyents a la classe I, aquests s'agrupen dins d'una mateixa àrea del gràfic, possibilitant d'una forma més adient la seva diferenciació. A més a més, els enzims de classe I presenten sensibilitat al glifosat que pot ser apreciada al gràfic, tenint més afinitat d'unió respecte a certs enzims de classe II (2GG6 i 4ZND).



Gràfic 2. Representació gràfica de l'energia d'afinitat del fosfoenolpiruvat per diversos enzims EPSPS. En color vermell es representen els enzims corresponents a la classe I. En color groc es representen els enzims corresponents a la classe II. Cada enzim està representat amb un marcador distingible i presenta 10 repeticions representades. Elaboració pròpia.

Observant el gràfic obtingut pel fosfoenolpiruvat, es pot distingir una separació en dues zones dels enzims de classe I i els de classe II, sent aquests últims els que presenten generalment

un major valor màxim d'energia d'afinitat. En primera instància, sembla que aquestes dues classes d'enzims es poden diferenciar aproximadament mitjançant una diagonal que separa ambdós enzims segons l'afinitat del fosfoenolpiruvat en comptes que amb l'afinitat del glifosat. No obstant això, existeixen enzims de classe I, com 3FK1 i 3FK0, que no compleixen aquesta divisió i se situen en la zona delimitada pels enzims de classe II. Per altra banda, es poden observar enzims de classe II, com 2GGA i 1RF6, que es situen en la zona delimitada pels enzims de classe I. Seguint les referències bibliogràfiques, s'ha evidenciat experimentalment que el gran canvi que presenten els enzims resistents al glifosat és la disminució dràstica de l'afinitat d'unió del glifosat en comparació als enzims sensibles que presenten una bona afinitat d'unió. D'altra banda, l'afinitat del fosfoenolpiruvat no és tan determinant per la classificació de la sensibilitat al glifosat. Aquest fet no es pot evidenciar en els resultats obtinguts per *docking*, ja que s'ha vist que es pot arribar a classificar la sensibilitat de l'enzim segons la seva localització en el gràfic.

1.1 ANÀLISI DELS ENZIMS AVALUATS

1.1.1 Enzims mutants

D'entre els enzims EPSPS analitzats, s'han detectat onze mutants; deu de classe I (amb codi: 1MI4, 1Q36, 2QFS, 2QFT, 2QFU, 2QFQ, 3FJZ, 3FJX, 3FK1, 3FK0) i un de classe II (amb codi: 2GGD). A través de l'anàlisi dels enzims, s'ha elaborat una llista dels mutants de l'enzim EPSPS que s'han detectat al PDB que recull la informació clau d'aquests (Annex 3).

El mutant 1MI4 presenta la mutació G96A esmentada anteriorment que causa una completa resistència al glifosat produïda per la protuberància del grup metil al lloc d'unió del glifosat. No obstant això, aquest canvi conformacional produeix alhora una disminució dràstica també de l'eficiència catalítica, ja que afecta també a l'afinitat del fosfoenolpiruvat (27).

Els mutants 2QFS i 2QFT, són enzims amb una seqüència d'aminoàcids idèntica que han sigut cristal·litzats amb glifosat i sense, respectivament. Aquests mutants presenten la mutació P101S la qual causa canvis conformacionals en residus propers que acaben restringint estructuralment el lloc d'unió pel glifosat. Això causa una disminució en l'afinitat i el poder inhibitori del glifosat, mentre no es veu gaire alterada l'afinitat d'unió del PEP i el S3P, mantenint així l'eficiència catalítica. Però, a moderades i altes concentracions de glifosat, aquest pot unir-se al seu lloc d'unió, afectant així a l'eficiència catalítica i acabant inhibint l'enzim (43,46).

Els mutants 2QFU i 2QFQ, són enzims amb una seqüència d'aminoàcids idèntica que han sigut cristal·litzats amb glifosat i sense, respectivament. Aquests mutants presenten la mutació P101L que confereix una disminució de l'afinitat tant pel shikimat-3-fosfat com pel fosfoenolpiruvat pels seus llocs d'unió. Alhora, també disminueix l'afinitat d'unió del glifosat, reduint la seva capacitat inhibidora (46).

Els mutants 3FJZ i 3FJX, són enzims amb una seqüència d'aminoàcids idèntica que han sigut cristal·litzats amb glifosat i sense, respectivament. Aquests mutants presenten la mutació T97I que afecta a la conformació del lloc d'unió del glifosat, fent que l'afinitat redueixi de manera ínfima. Aquests mutants encara són inhibits pel glifosat quan aquest està present en concentració moderada. A més a més, la mutació causa que l'afinitat del fosfoenolpiruvat pel lloc d'unió disminueixi, disminuint conseqüentment l'eficiència catalítica. Per tant, la mutació no és suficient per produir resistència al glifosat i mantenir alta afinitat pel substrat (48).

Els mutants 3FK1 i 3FK0, són enzims amb una seqüència d'aminoàcids idèntica que han sigut cristal·litzats amb glifosat i sense, respectivament. Aquests mutants presenten una doble mutació (P101S i T97I) que confereix una gran resistència al glifosat, mantenint alta afinitat pel fosfoenolpiruvat i el shikimat-3-fosfat i sense afectar a l'eficiència catalítica. Això es deu a diversos canvis conformacionals que acaben acurçant el lloc d'unió pel glifosat (48).

El mutant 2GGD és un enzim de classe II que pertany al grup d'enzim CP4, però que presenta la mutació A100G. Aquesta mutació restableix la sensibilitat al glifosat perquè, com s'ha explicat prèviament, justament la substitució inversa (el canvi del residu Glicina per Alanina) causa resistència al glifosat. A més a més, la substitució Gly100Ala que presentaven els enzims CP4, causava una disminució dràstica de l'afinitat del fosfoenolpiruvat pel seu lloc d'unió, afectant així l'eficiència catalítica. El restabliment d'aquesta mutació en el mutant 2GGD causa que augmenti l'eficiència catalítica encara que produeixi la sensibilitat al glifosat (47).

Aquests mutants pertanyents a la classe I o II, se'ls ha produït, de forma espontània o induïda, mutacions en certs residus del centre actiu i/o del voltant que causen canvis en la seva afinitat d'unió pel glifosat i/o pel fosfoenolpiruvat. Així doncs, aquests mutants no es poden utilitzar per analitzar els resultats de *docking* obtinguts i treure conclusions adequades. Per aquest motiu, s'ha decidit restablir la classificació dels enzims analitzats, distingint segons la sensibilitat o resistència al glifosat, i no segons la seva classe.

1.1.2 Enzims cristal·litzats amb glifosat

D'entre els enzims avaluats, s'han destacat tres enzims pertanyents a la classe II que presentaven certes diferències respecte als altres enzims d'aquesta classe. Aquests enzims són 2GGA, 3SLH i 1RF6 i presenten alta energia d'afinitat pel glifosat quan teòricament són resistents (Gràfic 1).

En primera instància, l'estructura 2GGA s'ha evidenciat que és completament idèntica a l'estructura 2GG6 (provenint de la mateixa referència bibliogràfica, del mateix organisme i tenint un 100 % d'alineament), només presentant un canvi en la forma en la qual s'han cristal·litzat. En el cas de 2GGA, presenta glifosat unit a l'estructura mentre que, en el cas de 2GG6, no presenta glifosat unit. Per realitzar el *docking*, l'estructura amb glifosat s'ha hagut de modificar per tal d'eliminar el glifosat de l'estructura. Si es comparen els resultats de *docking* d'ambdós casos, es veu una gran diferència en la qual, l'estructura que presentava unit glifosat, presenta una alta afinitat per l'herbicida mentre que, l'estructura que no presentava el glifosat unit, presenta una baixa afinitat per l'herbicida. El fet que l'única diferència fos la unió prèvia del glifosat a l'estructura, deix entreveure que aquesta molècula causa certs canvis conformacionals que modifiquen la seva afinitat per unir-se. Per aquest motiu, en estar avaluant molècules que només presenten shikimat-3-fosfat, s'hauria de tenir en compte l'estructura 2GG6. És a dir, només s'ha d'avaluar l'estructura que no presentava d'entrada el glifosat unit i que realment presenta una menor afinitat d'unió d'aquesta molècula respecte dels enzims de classe I. L'estructura correcta, 2GG6, correspon a l'enzim CP4, enzim que presenta la capacitat de poder unir glifosat amb afinitat, però de forma no inhibidora. Això és degut al fet que aquesta molècula s'uneix amb una altra conformació més compactada respecte a la seva conformació habitual d'unió que causa inhibició. Els resultats obtinguts concorden amb el fonament teòric, ja que els enzims CP4 encara que permeten la unió del glifosat, aquesta unió presenta menys afinitat respecte a la unió dels enzims sensibles a l'herbicida.

En el cas de l'estructura 3SLH, aquesta estructura és idèntica a l'estructura amb codi del PDB 4ZND (estructura que pertany a la primera zona de la classe II). Aquest cas és idèntic al cas anterior perquè l'estructura 3SLH presentava d'entrada glifosat unit mentre que l'estructura 4ZND no el presentava. Comparant els resultats de *docking*, també s'observa una gran diferència en la qual, en el cas de l'estructura que presentava ja unit glifosat, presenta una alta afinitat per l'herbicida-. Per altra banda, l'estructura que no presentava el glifosat unit, presenta una baixa

afinitat per l'herbicida. Per aquest motiu, en estar avaluant molècules que només presenten shikimat-3-fosfat, només s'hauria de tenir en compte l'estructura 4ZND. Per tant, s'ha d'avaluar l'estructura que no presentava d'entrada el glifosat unit i que realment presenta una menor afinitat d'unió d'aquesta molècula respecte dels enzims de classe I.

En l'últim cas, l'estructura 1RF6 presentava unida inicialment una molècula de glifosat durant la seva cristal·lització. Aquesta estructura del PDB prové d'un article el qual presenta diverses estructures idèntiques del PDB en les quals cadascuna presenta una molècula unida. D'aquestes estructures cap presentava només shikimat-3-fosfat unit, per la qual cosa cap altra estructura proteica es va poder analitzar l'estructura per *docking*. L'estructura que s'està analitzant, és una estructura que presenta shikimat-3-fosfat i glifosat i que realment no s'hauria d'avaluar perquè s'ha vist com la unió del glifosat produeix diversos canvis conformacionals que afecten l'afinitat del glifosat. Per aquest motiu, els resultats obtinguts d'aquesta estructura no poden ser considerats com a vàlids.

També s'han detectat diversos enzims de classe I que són idèntics entre si i que només una de les estructures presentava glifosat. Aquests enzims són: 2AAY i 2AA9; 2QFT i 2QFS; 3FJZ i 3FJX; 2QFU i 2QFQ; 1G6S i 1G6T, sent, en cada cas, el primer l'estructura amb glifosat i el segon l'estructura sense aquesta molècula. Les diferències d'energia d'afinitat entre cada parell d'estructures esmentades també són notòries, encara que no tant, en aquest tipus d'enzims.

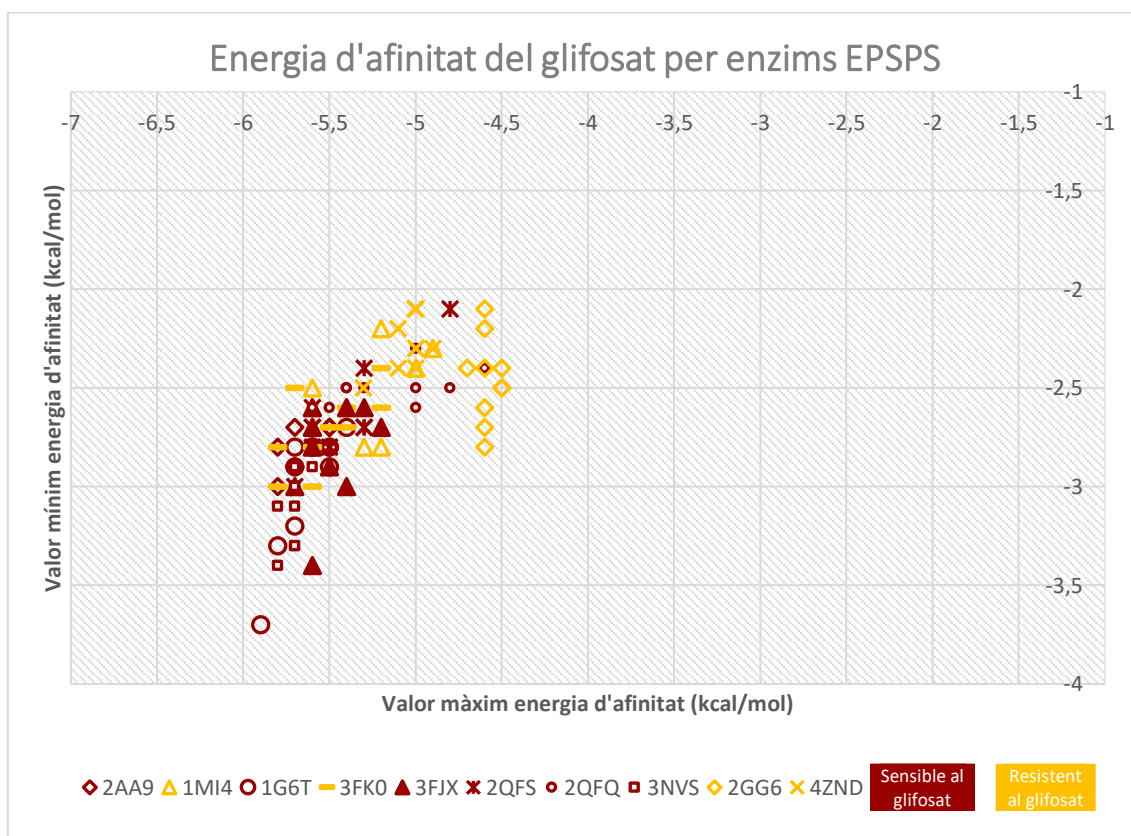
Tant en els enzims de classe I com els de classe II, es poden visualitzar les diferències d'energia d'afinitat esmentades entre cada parell d'enzims idèntics a l'Annex 2. A l'annex es mostren els valors d'energia d'afinitat i les ràtios d'afinitat GPJ/PEP calculades per a cada repetició de cada enzim analitzat. En aquestes ràtios d'afinitat es poden comparar ambdós estructures, com per exemple 2QFU i 2QFQ o 3FJZ i 3FJX, i es poden observar grans diferències a través del color de la casella, canviant dràsticament d'una estructura a una altra. Aquest fet deixa entreveure el canvi no conegut que causa el glifosat en unir-se al centre actiu de l'estructura proteica i que ha de ser tingut en compte, ja que té efecte en els valors d'energia d'afinitat.

Considerant l'anàlisi elaborat dels enzims avaluats, és de gran importància representar els resultats obtinguts per *docking* per cada enzim separant-los segons si són realment sensibles o resistents, independentment de la classe que presentin. D'aquesta manera, s'aconsegueix evitar els possibles problemes de classificació dels enzims mutants i així poder observar si els

resultats de *docking* poden ser útils per tal de poder distingir els enzims segons la seva sensibilitat al glifosat. També és important excloure els enzims que presentaven prèviament glifosat unit en les noves representacions dels resultats. Com s'ha evidenciat, la presència de la molècula en l'estructura prèviament a l'anàlisi per *docking*, causa canvis notables dels resultats del *docking*, variant dràsticament l'energia d'afinitat. Per tant, només es representaran enzims que no hagin sigut cristal·litzats amb la molècula inhibidora.

2. RESULTATS D'ENERGIA D'AFINITAT SEGONS SENSIBILITAT AL GLIFOSAT

Finalment, s'ha decidit mostrar els gràfics d'energia d'afinitat del glifosat (Gràfic 3) i el fosfoenolpiruvat (Gràfic 4) els quals presenten una separació segons la seva sensibilitat al glifosat, obtenint-se dos tipus d'enzims: sensibles o resistent. Els enzims s'han classificat a partir de la informació obtinguda bibliogràficament de la investigació experimental on els van utilitzar.

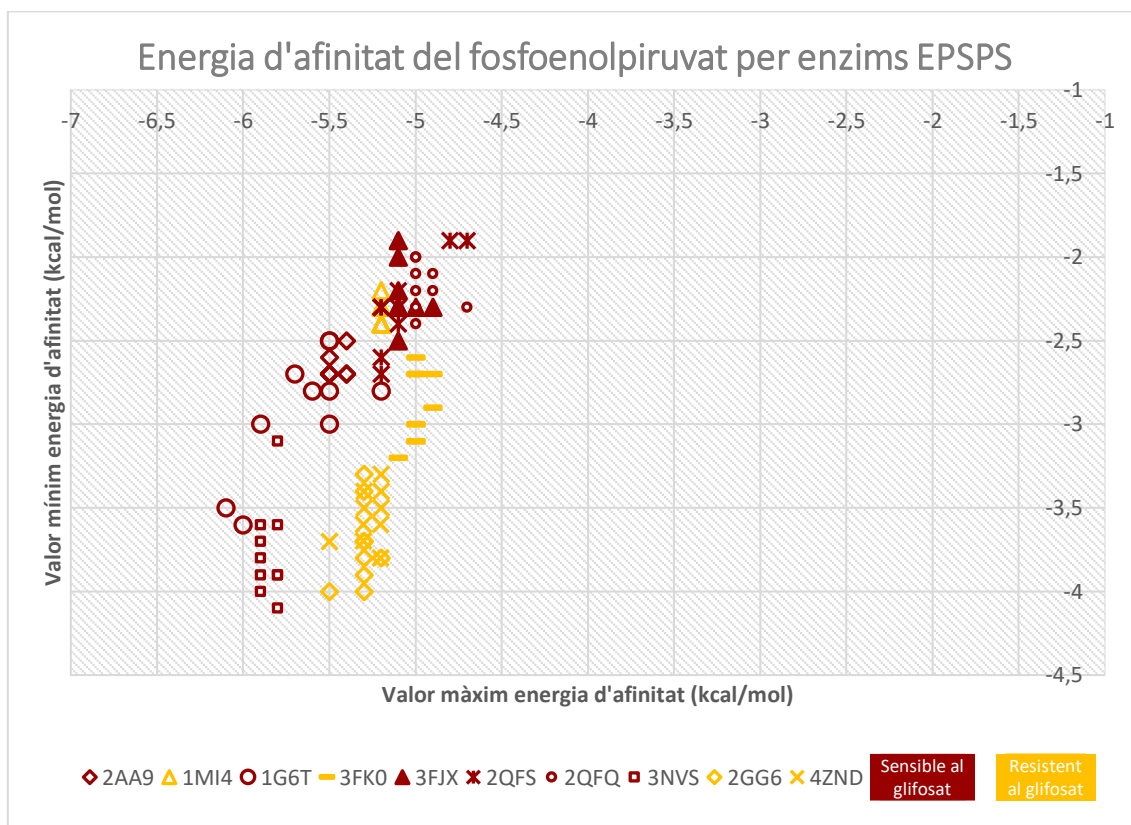


Gràfic 3. Representació gràfica de l'energia d'afinitat del glifosat per diversos enzims EPSPS. En color vermell es representen els enzims sensibles al glifosat. En color groc es representen els enzims resistent al glifosat. Cada enzim està representat amb un marcador distingible i presenta 10 repeticions representades. Elaboració pròpia.

En primera instància, es pot visualitzar l'existència de dues zones les quals corresponen a cada tipus d'enzim, sensibles i resistents. Les zones estan separades i delimitades pels punts de cada enzim. En termes generals, es pot observar com la zona de resistència al glifosat se situa a la part superior dreta i que, per tant, els enzims d'aquesta zona presenten menys energia d'afinitat pel glifosat. Per altra banda, la zona de sensibilitat al glifosat se situa a la part inferior esquerra i els enzims presenten major energia d'afinitat per l'herbicida respecte els enzims classificats com resistents segons resultats experimentals.

La zona de resistència està composta tant per enzims mutants com no mutants. Els enzims no mutants (2GG6 i 4ZND) són els enzims que realment permeten la diferenciació d'ambdues zones, ja que presenten una menor energia d'afinitat respecte als enzims sensibles. Per altra banda, existeixen dos enzims classificats com a resistents que estan situats dins de la zona delimitada pels enzims sensibles. Aquests dos enzims (1MI4 i 3FK0) són enzims mutants que al principi eren sensibles, però que gràcies a mutacions puntuals s'ha aconseguit la seva resistència a l'herbicida. Com s'ha comentat, és esperable que presentin una menor energia d'afinitat del glifosat perquè presenten una mutació que disminueix l'afinitat d'aquest lligand. Els resultats de *docking* no mostren directament aquesta baixada de l'afinitat, ja que els punts d'ambdós enzims mutants se situen dins de la zona de sensibilitat al glifosat. No obstant això, els valors estan situats pròxims a la zona de resistència, fet que deixa entreveure la seva menor afinitat pel glifosat respecte a la majoria d'enzims que són sensibles.

La zona de sensibilitat està composta per ambdós tipus d'enzims, mutants i no mutants. Els enzims no mutants (2AA9, 1G6T i 3NVS) presenten una alta energia d'afinitat pel glifosat com es pot veure amb la seva localització al gràfic. D'entre aquests tres enzims, l'enzim 2AA9 és el que presenta valors menors d'energia d'afinitat respecte als altres, fet que el situa més amunt en el gràfic. Respecte als enzims mutants (3FJX, 2QFS i 2QFQ), aquests estan situats a la part superior de la zona de sensibilitat, pròxims a la zona de resistència. Això és perquè aquests mutants presenten mutacions en residus evolutivament conservats amb l'objectiu d'aconseguir la resistència al glifosat. Aquestes mutacions causen que l'energia d'afinitat pel glifosat disminueixi, però, en aquest cas, no prou per a proporcionar resistència, i, per tant, només presenten certa tolerància en casos d'abundància de glifosat. En el cas concret dels enzims 2QFQ i 2QFS, alguns valors se situen inclús dins de la zona de resistència, evidenciant la seva tolerància al glifosat en algunes situacions.



Gràfic 4. Representació gràfica de l'energia d'afinitat del fosfoenolpiruvat per diversos enzims EPSPS. En color vermell es representen els enzims sensibles al glifosat. En color groc es representen els enzims resistent al glifosat. Cada enzim està representat amb un marcador distingible i presenta 10 repeticions representades. Elaboració pròpia.

Finalment en el gràfic d'energia d'afinitat del fosfoenolpiruvat, es pot apreciar una major separació dels punts d'enzims sensibles i resistent al glifosat. En aquest gràfic, es poden representar aproximadament les zones de resistència i sensibilitat al glifosat mitjançant una diagonal. A la part superior d'aquesta es pot establir la zona de sensibilitat al glifosat mentre que a la part inferior es pot establir la zona de resistència.

La zona de sensibilitat presenta diversos enzims tant mutats com no mutats. En el cas dels enzims no mutats (2AA9, 1G6T i 3NVS), aquests enzims presenten, de forma general, una major energia d'afinitat respecte als enzims mutats i els enzims resistent. En el cas dels enzims mutats (3FJX, 2QFS i 2QFQ), és important destacar que presenten menor energia d'afinitat i que, per tant, estan situats a la part superior dreta de la zona de sensibilitat. En aquests enzims mutats, encara que presenten sensibilitat al glifosat, l'afinitat pel fosfoenolpiruvat es veu alterada deguda a les mutacions produïdes, causant la seva disminució.

La zona de resistència presenta també enzims mutants i no mutants. En el cas dels enzims no mutants (2GG6 i 4ZND), aquests enzims presenten alta afinitat d'unió del fosfoenolpiruvat. Aquest fet és evidenciat amb els valors d'energia d'afinitat del lligand, que estan representats a la part inferior de la zona de resistència. En el cas dels enzims no mutants resistents (1MI4 i 3FKO), al contrari que en el gràfic del glifosat, sí que presenten uns resultats esperables. En el primer cas, l'enzim 1MI4 presenta una mutació produïda que produeix una baixa dràstica de l'afinitat del fosfoenolpiruvat, fet que es pot evidenciar en el gràfic a través de la baixa energia d'afinitat. La mutació produeix que aquest enzim se situï dins de la zona de sensibilitat. Seguint amb l'enzim 3FKO, aquest enzim presenta dues mutacions que produeixen un manteniment de l'afinitat del fosfoenolpiruvat en termes generals, fet que es pot observar en el gràfic. Els valors d'energia d'afinitat del fosfoenolpiruvat per aquest enzim es mantenen dins de la zona de resistència encara que estan situats per sobre dels enzims resistents, donant a entendre que l'afinitat no és tan alta com en enzims resistents o en enzims sensibles al glifosat.

CONCLUSIONS

De forma general, es pot arribar a la conclusió que els resultats obtinguts per *docking* són resultats esperables, ja que s'ajusten a les evidències experimentals descrites en les referències bibliogràfiques. S'ha observat com, a través de l'anàlisi de les energies d'afinitat obtingudes per *docking* dels lligands glifosat i fosfoenolpiruvat, es pot establir una zona d'enzims considerats resistents i una altra d'enzims sensibles al glifosat. Aquestes zones permeten la classificació de la potencial sensibilitat dels enzims EPSPS. Es pot concloure que, a través de l'ús del *docking*, els enzims sensibles al glifosat es poden classificar perquè presenten generalment una major energia d'afinitat pel glifosat respecte als enzims resistents. No obstant això, hi ha enzims mutants que no compleixen amb aquesta separació per zones i que presenten valors d'energia d'afinitat que no s'ajusten de les dades experimentals. Un exemple és l'enzim 3FKO el qual presenta valors d'energia d'afinitat del glifosat que el situen en la zona de sensibilitat quan realment és resistent. En aquest cas, és imprescindible visualitzar també els valors d'energia d'afinitat del fosfoenolpiruvat, ja que són els que realment determinen a l'enzim com a resistent. Per tant, durant l'anàlisi de la sensibilitat al glifosat dels enzims EPSPS per *docking*, és essencial tenir en compte tant els valors d'energia d'afinitat del glifosat com del fosfoenolpiruvat.

Per altra banda, és necessari tenir en compte que l'adquisició de la resistència al glifosat pot ser deguda a canvis molt subtils en residus del centre actiu de l'enzim. Un exemple és el cas del mutant 1MI4 que presenta la mutació Gly96Ala, la qual causa un canvi en l'orientació d'un grup metil que produeix resistència al glifosat que no s'ha pogut detectar pel mètode de *docking*. Per aquest motiu, en alguns casos, pot ser realment difícil disposar de la sensibilitat necessària per distingir enzims sensibles o resistents per *docking* tenint en compte aquests petits canvis estructurals que poden causar canvis dràstics respecte a la sensibilitat de l'enzim al glifosat.

A través de les ràtios d'afinitat glifosat/fosfoenolpiruvat mostrats en aquest treball, s'ha evidenciat que la unió del glifosat en el seu lloc d'unió al centre actiu de l'enzim EPSPS produeix canvis conformacionals. Aquests canvis són de gran importància per la seva implicació en l'afinitat d'unió dels substrats i el glifosat. L'estudi, en un futur, de l'efecte de la unió del glifosat al centre actiu de l'enzim EPSPS pot provocar descobriments fonamentals en l'àmbit d'estudi d'aquests enzims i que poden ser claus pel desenvolupament de tècniques d'identificació de sensibilitat per *docking*.

Bibliogràficament, s'havia destacat la gran variació en l'afinitat d'unió del glifosat entre enzims resistents i sensibles. No obstant això, l'afinitat d'unió del fosfoenolpiruvat entre els dos tipus d'enzims no s'havia considerat com una possible evidència per a predir la potencial sensibilitat de l'enzim. Durant la investigació duta a terme, s'ha evidenciat clarament la necessitat de tenir en compte tant l'anàlisi per *docking* del glifosat com del fosfoenolpiruvat. Observant els resultats s'ha pogut destacar una certa tendència diferent dels enzims resistents i sensibles respecte al fosfoenolpiruvat, en els quals els resistents presentaven més energia d'afinitat, sobretot en el valor mínim d'energia, pel substrat respecte als sensibles.

Finalment és de gran importància ressaltar la mancança d'enzims EPSPS per avaluar per culpa de les condicions específiques que aquests havien de presentar, com per exemple la presència del S3P unit a l'estructura. Aquesta falta d'enzims causa que els resultats obtinguts no puguin ser prou representables respecte als enzims EPSPS. El mètode *docking* és un mètode innovador en la classificació i avaluació d'enzims EPSPS que encara no està desenvolupat d'una forma òptima. La investigació duta a terme i les evidències mostrades en aquesta, serveixen com un punt de partida per al desenvolupament d'un model de probabilitat basat en *docking* que permet la predicció de la potencial sensibilitat a l'enzim. Tanmateix, en un futur s'hauran

d'utilitzar més enzims per a optimitzar el mètode per a ser utilitzat per classificar nous enzims EPSPS. Tenint en compte l'escassetat de complexos EPSPS-S3P disponibles en la base de dades del PDB, aquesta investigació té com a nou objectiu seguir amb la recerca sobre la distinció d'enzims segons la sensibilitat. Es vol anar un pas més enllà i utilitzar seqüències que no presenten S3P unit. Es volen analitzar estructures creades per homologia a partir d'estructures model amb shikimat per tal que els models obtinguts presentin la conformació necessària al centre actiu per a la unió del fosfoenolpiruvat i el glifosat. Aquest fet permetrà l'obtenció d'un major nombre d'estructures proteiques que poden ser analitzades i que ajudaran a l'establiment del model de predicció de la potencial sensibilitat d'enzims a través de *docking*. A més a més, l'ús d'altres programes de *Docking* basats en altres algoritmes i funcions i la consideració de valors experimentals d'altres investigacions, permetran el contrastament dels resultats per a una millor optimització del model de predicció.

AUTOAVALUACIÓ

Aquest treball dut a terme a través de la meva estada de pràctiques, ha resultat tot un repte a escala acadèmica com personal. Treballar amb el suport d'en Dr. Gerard Pujadas, en Dr. Santi Garcia Vallvé i del grup de recerca de Quimioinformàtica i Nutrició i el Dr. Pere Puigbò en col·laboració amb el grup de recerca del laboratori *Helander-Saikkonen* ha sigut molt satisfactori. Estar treballant des de casa i alhora poder tenir el suport dels integrants del grup de recerca ha sigut realment motivador, tenint en compte que s'ha treballat en un camp tant complicat com interessant com és la bioinformàtica.

Durant l'estada he pogut adquirir tots els coneixements plasmats en aquesta memòria que m'han introduït d'una forma immersiva en el món del glifosat i de l'ús del *docking* com a eina computacional. El meu totalment desconeixement inicial del tema tractat em produïa certs dubtes sobre la investigació, tenint moderades expectatives. Tanmateix, en iniciar l'estada de pràctiques, les meves expectatives es van veure del tot superades gràcies al gran interès en l'estudi que s'estava realitzat i al gran equip que formava part d'aquest. És important destacar que, a través d'aquesta experiència, he pogut conèixer i endinsar-me realment en el món de la bioinformàtica. Gràcies a aquesta investigació, he pogut aprendre una gran quantitat de conceptes i coneixements relacionats amb la bioinformàtica, a més d'aprendre a utilitzar certs programes informàtics els quals he manipulat constantment.

Aquesta estada ha despertat un gran interès per la bioinformàtica que no presentava anteriorment i que estic disposat a continuar a través d'estudis postgraus. El fet d'estar constantment en contacte amb els integrants del grup de recerca, els quals presenten un excel·lent coneixement i experiència, m'ha ajudat a adquirir una dinàmica de treball adequada. A més d'això, m'he sentit del tot integrat dins del grup gràcies a la gran professionalitat amb la qual es treballa, la possibilitat de poder intervenir i opinar lliurement i, en general, a la gran ajuda que se m'oferia en tot moment.

Per últim, vull dedicar unes paraules d'agraïment a totes les persones que han participat, directament o indirectament, en el procés de creació del treball. Aquest treball ha requerit un gran esforç i dedicació i sense la seva ajuda el treball no hagués vist la llum. Sobretot vull expressar el meu agraïment al meu tutor acadèmic, el Dr. Gerard Pujadas, i als Drs. Santi Garcia Vallvé i Pere Puigbò perquè han sigut pilars fonamentals en aquesta investigació. Gràcies a les reunions setmanals, als seus consells i a l'atenció prestada, he pogut encaminar d'una forma adequada la investigació, aconseguint un resultat en forma de Treball de Fi de Grau del qual estic orgullós.

BIBLIOGRAFIA

1. O Duke S, B Powles S. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci*. 2008;64(4):319–25. DOI: 10.1002/ps.1518.
2. de Castilhos Ghisi N, Zuanazzi NR, Fabrin TMC, Oliveira EC. Glyphosate and its toxicology: A scientometric review. *Sci Total Environ*. 2020;733:139359. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139359.
3. Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, Carroll L, Colborn T, Everett LG, et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Health*. 2016;15:19. DOI: 10.1186/s12940-016-0117-0.
4. Gould F, Amasino RM, Brossard D, Buell CR, Dixon RA, Falck-Zepeda JB. *Genetically Engineered Crops: experiences and prospects* [Internet]. Washington, D.C.: National Academies Press; 2016. 72–86. Disponible a: <https://www.nap.edu/catalog/23395>. DOI: 10.17226/23395.
5. Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur*. 2016;28(3):1–15. DOI: 10.1186/s12302-016-0070-0.
6. O Duke S, B Powles S. The history and current status of glyphosate. *Pest Manag Sci*. 2017;74(5):1027–34. DOI: 10.1002/ps.4652.

7. Maeda H, Dudareva N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2012;63:73–105. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105439.
8. O Duke S, E Dayan F, Barker A, Bough R, Ortiz M, Takano H. Bioactivity of Herbicides. Dins: Moo-Young M, editor. *Comprehensive Biotechnology.* 3a ed. Elsevier ; 2019. p. 36–48.
9. Van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci Total Environ.* 2018;616–617:255–68. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.309.
10. Sidhu GK, Singh S, Kumar V, Dhanjal DS, Datta S, Singh J. Toxicity, monitoring and biodegradation of organophosphate pesticides: A review. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 2019;49(13):1135–87. DOI: 10.1080/10643389.2019.1565554.
11. Mesnage R, Antoniou MN. Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides. *Front Public Health.* 2018;5:361. DOI: 10.3389/fpubh.2017.00361.
12. Singh S, Kumar V, Gill JPK, Datta S, Singh S, Dhaka V, et al. Herbicide glyphosate: Toxicity and microbial degradation. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(20):7519. DOI: 10.3390/ijerph17207519.
13. Arango L, Buddrus-Schiemann K, Opelt K, Lueders T, Haesler F, Schmid M, et al. Effects of glyphosate on the bacterial community associated with roots of transgenic Roundup Ready® soybean. *Eur J Soil Biol.* 2014;63:41–8. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2014.05.005.
14. Bai SH, Ogbourne SM. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016;23(19):18988–9001. DOI: 10.1007/s11356-016-7425-3.
15. Camacho A, Mejía D. The health consequences of aerial spraying illicit crops: The case of Colombia. *J Health Econ.* 2017;54:147–60. DOI: 10.1016/j.jhealeco.2017.04.005.
16. Perego MC, Schutz LF, Caloni F, Cortinovis C, Albonico M, Spicer LJ. Evidence for direct effects of glyphosate on ovarian function: glyphosate influences steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa but not theca cells in vitro. *J Appl Toxicol.* 2017;37(6):692–8. DOI: 10.1002/jat.3417.
17. Gómez-Gallego C, Gómez-Gallego C, Rainio MJ, Carmen Collado M, Carmen Collado M, Mantziari A, et al. Glyphosate-based herbicide affects the composition of microbes associated with Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *FEMS Microbiol Lett.* 2019;367(6). DOI: 10.1093/femsle/fnaa050.
18. Motta EVS, Mak M, de Jong TK, Powell JE, O'Donnell A, Suhr KJ, et al. Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. *J Appl Environ Microbiol.* 2020;86(18). DOI: 10.1128/AEM.01150-20.

19. Motta EVS, Raymann K, Moran NA. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(41):10305–10. DOI: 10.1073/pnas.1803880115.
20. Motta EVS, Moran NA. Impact of Glyphosate on the Honey Bee Gut Microbiota: Effects of Intensity, Duration, and Timing of Exposure. *mSystems*. 2020;5(4). DOI: 10.1128/msystems.00268-20.
21. Blot N, Veillat L, Rouzé R, Delatte H. Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLoS One*. 2019;14(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0215466.
22. Dai P, Yan Z, Ma S, Yang Y, Wang Q, Hou C, et al. The Herbicide Glyphosate Negatively Affects Midgut Bacterial Communities and Survival of Honey Bee during Larvae Reared in Vitro. *J Agric Food Chem*. 2018;66(29):7786–93. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b02212.
23. Hertel R, Gibhardt J, Martienssen M, Kuhn R, Commichau FM. Molecular mechanisms underlying glyphosate resistance in bacteria. *Environ Microbiol*. 2021. Publicació avançada en línia. Disponible a: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.15534>. DOI: 10.1111/1462-2920.15534.
24. Leino L, Tall T, Helander M, Saloniemi I, Saikkonen K, Ruuskanen S, et al. Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide. *J Hazard Mater*. 2021;408. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124556.
25. Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Hernández-Carlos B, Villanueva-Cañongo C. Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. Dins: Soto-Hernández M, García-Mateos R, Palma-Tenango M, editors. *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*. IntechOpen; 2019. DOI: 10.5772/intechopen.83815.
26. Han Q, Phillips RS, Li J. Aromatic amino acid metabolism. *Front Mol Biosci*. 2019;6(22). DOI: 10.3389/fmolb.2019.00022.
27. Eschenburg S, Healy ML, Priestman MA, Lushington GH, Schönbrunn E. How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Planta*. 2002;216(1):129–35. DOI: 10.1007/s00425-002-0908-0.
28. Stallings WC, Abdel-Meguid SS, Lim LW, Shieh H-S, Dayringer HE, Leimgruber NK, et al. Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase: A distinctive protein fold: x-ray crystallography/aromatic amino acid biosynthesis/herbicide/helical macrodipole. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:5046–50. DOI: 10.1073/pnas.88.11.5046.

29. Schöbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth WA, Schloss J v, Amrhein N, Evans JNS, et al. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(4):1376–80. DOI: 10.1073/pnas.98.4.1376.
30. Mizyed S, Wright JEI, Byczynski B, Berti PJ. Identification of the catalytic residues of AroA (Enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase) using partitioning analysis. *Biochemistry*. 2003;42(23):6986–95. DOI: 10.1021/bi027217l.
31. Pollegioni L, Schonbrunn E, Siehl D. Molecular basis of glyphosate resistance - Different approaches through protein engineering. *FEBS J*. 2011;278(16):2753–66. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08214.x.
32. Alibhai MF, Stallings WC. Closing down on glyphosate inhibition-with a new structure for drug discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(6):2944–6. DOI: 10.1073/pnas.061025898.
33. Park H, Hilsenbeck JL, Kim HJ, Shuttleworth WA, Park YH, Evans JN, et al. Structural studies of *Streptococcus pneumoniae* EPSP synthase in unliganded state, tetrahedral intermediate-bound state and S3P-GLP-bound state. *Mol Microbiol*. 2004;51(4):963–71. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03885.x.
34. Tripathi A, Bankaitis VA. Molecular *Docking*: From Lock and Key to Combination Lock. *J Mol Med Clin Appl*. 2017;2(1). DOI: 10.16966/2575-0305.106.
35. Fonseca ECM, da Costa KS, Lameira J, Alves CN, Lima AH. Investigation of the target-site resistance of EPSP synthase mutants P106T and T102I/P106S against glyphosate. *RSC Adv*. 2020;10(72):44352–60. DOI: 10.1039/d0ra09061a.
36. Firdous S, Iqbal S, Anwar S, Jabeen H. Identification and analysis of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) gene from glyphosate-resistant *Ochrobactrum intermedium* Sq20. *Pest Manag Sci*. 2018;74(5):1184–96. DOI: 10.1002/ps.4624.
37. Eschenburg S, Kabsch W, Healy ML, Schonbrunn E. A new view of the mechanisms of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) and 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (AroA) derived from X-ray structures of their tetrahedral reaction intermediate states. *J Biol Chem*. 2003;278(49):49215–22. DOI: 10.1074/jbc.M309741200.
38. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces [Internet]. *PubChem Compound Summary for CID 1005, Phosphoenolpyruvate*. 2021 [citad 2021 Maig 20]. Disponible a: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1005#section=3D-Conformer>.

39. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces [Internet]. PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate. 2021 [citad 2021 Maig 20]. Disponible a: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3496#section=3D-Conformer>.
40. Gaines TA, Duke SO, Morran S, Rigon CAG, Tranel PJ, Anita Küpper, et al. Mechanisms of evolved herbicide resistance. *J Bio Chem*. 2020;295(30):10307–30. DOI: 10.1074/jbc.REV120.013572.
41. Gaines TA, Patterson EL, Neve P. Molecular mechanisms of adaptive evolution revealed by global selection for glyphosate resistance. *New Phytol*. 2019;223(4):1770–5. DOI: 10.1111/nph.15858.
42. Heap I, Duke SO. Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Manag Sci*. 2018;74(5):1040–9. DOI: 10.1002/ps.4760.
43. Sammons RD, Gaines TA. Glyphosate resistance: State of knowledge. *Pest Manag Sci*. 2014;70(9):1367–77. DOI: 10.1002/ps.3743.
44. Zhou M, Xu H, Wei X, Ye Z, Wei L, Gong W, et al. Identification of a glyphosate-resistant mutant of rice 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase using a directed evolution strategy. *Plant Physiol*. 2006;140(1):184–95. DOI: 10.1104/pp.105.068577.
45. Rainio MJ, Ruuskanen S, Helander M, Saikkonen K, Saloniemi I, Puigbò P. Adaptation of bacteria to glyphosate: a microevolutionary perspective of the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Environ Microbiol Rep*. 2021;13(3):309–16. DOI: 10.1111/1758-2229.12931.
46. Healy-Fried ML, Funke T, Priestman MA, Han H, Schönbrunn E. Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro101 in *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *J Bio Chem*. 2007;282(45):32949–55. DOI: 10.1074/jbc.M705624200.
47. Funke T, Han H, Healy-Fried ML, Fischer M, Schönbrunn E. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(35):13010–5. DOI: 10.1073/pnas.0603638103.
48. Funke T, Yang Y, Han H, Healy-Fried M, Olesen S, Becker A, et al. Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97 → Ile and Pro101 → Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J Bio Chem*. 2009;284(15):9854–60. DOI: 10.1074/jbc.M809771200.
49. Light SH, Krishna SN, Minasov G, Anderson WF. An Unusual Cation-Binding Site and Distinct Domain-Domain Interactions Distinguish Class II Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthases. *Biochemistry*. 2016;55(8):1239–45. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00553.

50. Yi SY, Cui Y, Zhao Y, Liu ZD, Lin YJ, Zhou F. A Novel Naturally Occurring Class I 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase from *Janibacter* sp. Confers High Glyphosate Tolerance to Rice. *Sci Rep.* 2016;6. DOI: 10.1038/srep19104.
51. Priestman MA, Funke T, Singh IM, Crupper SS, Schönbrunn E. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. *FEBS Lett.* 2005;579(3):728–32. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.12.057.
52. Carozzi N, Carr B, Hammer P. Identification of a new class of EPSPS synthases. European Patent 2295548A1. Apr. 2006.
53. He M, Yang Z-Y, Nie Y-F, Wang J, Xu P. A new type of class I bacterial 5-enopyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutants with enhanced tolerance to glyphosate. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1568(1). DOI: 10.1016/S0304-4165(01)00181-7.
54. Ferreira LG, dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD. Molecular *docking* and structure-based drug design strategies. *Molecules.* 2015;20(7):13384–421. DOI: 10.3390/molecules200713384.
55. Li J, Fu A, Zhang L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular *Docking*. *Interdiscip Sci.* 2019;11(2):320–8. DOI: 10.1007/s12539-019-00327-w.
56. Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular *docking*: a review. *Biophys Rev.* 2017;9(2):91–102. DOI: 10.1007/s12551-016-0247-1.
57. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of *docking* with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455–61. DOI: 10.1002/jcc.21334.
58. Guedes IA, Pereira FSS, Dardenne LE. Empirical scoring functions for structure-based virtual screening: Applications, critical aspects, and challenges. *Front Pharmacol.* 2018;9. DOI: 10.3389/fphar.2018.01089.
59. Macari G, Toti D, Pasquadibisceglie A, Polticelli F. *DockingApp* RF: A State-of-the-Art Novel Scoring Function for Molecular *Docking* in a User-Friendly Interface to AutoDock Vina. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24). DOI: 10.3390/ijms21249548.
60. Vieira TF, Sousa SF. Comparing AutoDock and Vina in ligand/decoy discrimination for virtual screening. *Appl Sci.* 2019;9(21). DOI: 10.3390/app9214538.

ANNEXOS

Per visualitzar i consultar els annexos del Treball de Fi de Grau s'han disposat a continuació tres possibles opcions. Es recomana descarregar l'arxiu en comptes de visualitzar-lo en línia per a disposar de la màxima qualitat dels annexos.



<https://tinyurl.com/annexos-tfg>

https://drive.google.com/drive/folders/1_-D5hla6m-7LsxyTKWlcrTDNXQJS_7qq?usp=sharing