

TUGAS CARBOHYDRATE METABOLISM DISORDER

GALAKTOSEMIA



Oleh:

Dr. Zenia Angelina

Pembimbing :

Prof. drh. Aulani'am, DESS.

PROGRAM PASCA SARJANA ILMU BIOMEIK

PROGRAM DOUBLE DEGREE ILMU KESEHATAN ANAK

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

PENDAHULUAN

Galaktosemia adalah suatu kelainan metabolik yang diturunkan secara autosomal resesif, dimana terdapat defisiensi enzim yang mempengaruhi metabolime gula galaktosa. Galaktosemia diturunkan oleh kedua orang tua dan tidak terkait dengan *x-linked* sehingga dapat diturunkan baik oleh laki-laki maupun perempuan.

Ada 3 macam defisiensi enzim pada galaktosa, yaitu :

Type	Gene	Locus	Enzyme	Name
1	GALT	9p13	Galactose-1-phosphate uridyl transferase	Galaktosemia klasik
2	GALK1	17q24	Galactokinase	Defisiensi galaktokinase
3	GALE	1p36- p35	UDP galactose epimerase	Defisiensi galaktose epimerase / UDP-Galactose-4-epimerase

Bentuk galaktosemia yang paling sering dan juga paling parah adalah GALT yang disebabkan karena kerusakan gen GALT pada kromosom 9. Sebagai akibat dari kerusakan gen tersebut adalah defisiensi total aktivitas enzim tersebut di seluruh sel tubuh. Individu dengan galaktosemia tidak dapat memecah maupun menggunakan gula galaktosa.

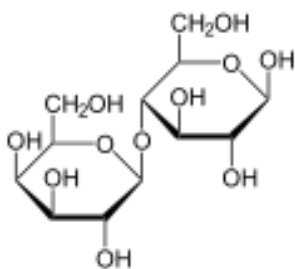
Penderita dengan galaktosemia klasik akan menunjukkan gejala berupa gangguan gastrointestinal, berat badan tidak naik, dan jaundice. Infeksi yang mengancam jiwa dapat terjadi saat periode baru lahir. Selain itu, dapat menyebabkan retardasi mental dan pertumbuhan fisik yang terlambat pada bayi yang hidup. Beberapa bayi dengan level GALT yang rendah seringkali didiagnosa sebagai galaktosemia bentuk Duarte variant. Hampir seluruh kasus Duarte variant merupakan bentuk benigna, akan tetapi semua bayi yang terkena tetap diterapi pada setahun pertama kehidupannya sebagai pencegahan.

Bayi dengan defisiensi GALK hanya menunjukkan gejala katarak. Sedangkan pada bayi dengan defisiensi GALE mempunyai gejala yang lebih bervariasi. Bila defisiensi GALE terdapat pada sel darah merah, maka bayi tidak akan menunjukkan gejala dan tidak perlu diterapi. Akan tetapi, bila defisiensi GALE melibatkan jaringan lain, maka dapat timbul gejala yang serupa dengan defisiensi GALT

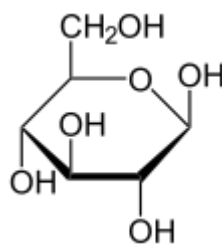
Insidens defisiensi GALT diperkirakan 1:60.000, sedangkan galaktosemia bentuk Duarte variant sekitar 1:16.000. Untuk defisiensi GALK dan defisiensi GALE tidak diketahui akan tetapi diperkirakan kejadiannya adalah jarang dan sangat jarang. Prevalensi terhadap variasi mutasi pada gen juga berbeda dari tiap kelompok etnik. Sebagai contoh, etnik Kaukasia sering terjadi mutasi Q188R dibandingkan dengan etnik Afrika-Amerika.

Galaktosa adalah suatu karbohidrat monosakarida (gula sederhana) yang merupakan bagian dari laktosa dan banyak ditemukan dalam produk makanan sehari-hari. Galaktosa jarang terjadi secara alami sebagai gula tunggal. Galaktosa di dalam hepar akan diubah menjadi glukosa.

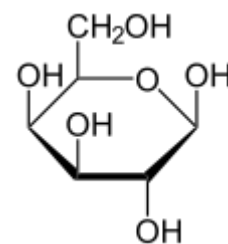
Secara biokimia, laktosa akan dipecah menjadi glukosa dan galaktosa oleh suatu enzim laktase. Pada individu dengan galaktosemia, enzim-enzim yang diperlukan untuk metabolisme selanjutnya mengalami defisiensi sehingga mengakibatkan toksisitas glukosa-1-fosfat pada berbagai jaringan (pada defisiensi GALT) yang menimbulkan gejala hepatomegali, sirosis, gagal ginjal katarak, kerusakan otak dan kegagalan ovarium. Tanpa terapi yang tepat, mortalitas pada bayi dengan galaktosemia berkisar 75%.



Laktosa

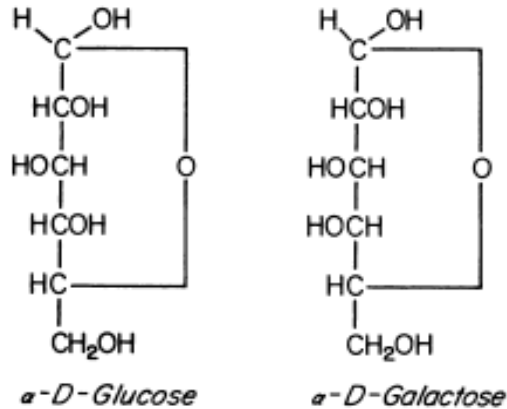


Glukosa



Galaktosa

Seperti yang telah disebutkan di atas bahwa sebagian besar diet galaktosa diperoleh dalam bentuk laktosa, suatu karbohidrat utama dalam susu. Di dalam usus, laktosa kemudian akan dipecah menjadi 2 komponen monosakarida, yaitu galaktosa dan glukosa.



Kedua bentuk gula ini hanya dibedakan dari orientasi gugus hydrogen dan hidroksil pada atom karbon keempat. Galaktosa mungkin bergabung dengan lipid membentuk galactolipid, atau bergabung dengan polisakarida membentuk muco-polisakarida (kondroitin sulfat). Akan tetapi yang paling penting, galaktosa akan dirubah menjadi derivat glukosa yang penting untuk penyediaan energi. Bagaimana galaktosa memasuki “kolam energi” glukosa telah dijelaskan sebagai hasil investigasi oleh Leloir, Kalekar dan kawan-kawan.

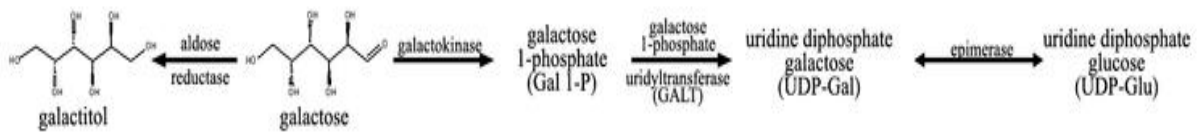
Langkah pertama dari jalur ini adalah fosforilasi galaktosa menjadi α -galaktosa-1-fosfat. Dimana untuk jalur ini dibutuhkan adenosine trifosfat (ATP) dan enzim spesifik, galaktokinase.



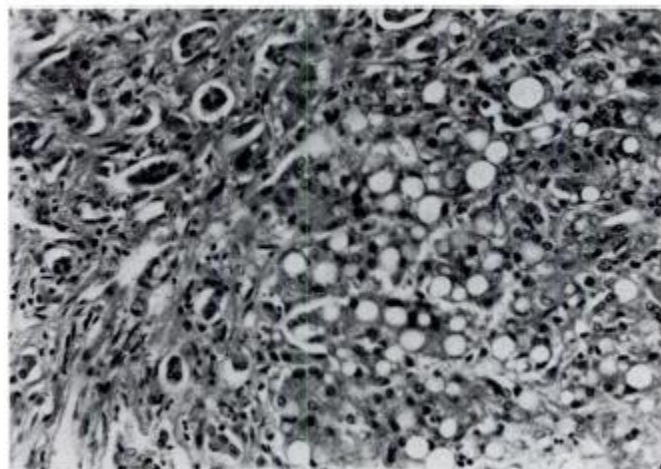
Galaktosa-1-fosfat kemudian akan dirubah menjadi glukosa-1-fosfat oleh reaksi kedua yang melibatkan nukleotida spesifik, uridin difosfoglukosa (UDPGlukosa). Pada reaksi ini galaktosa-1-fosfat akan ditransfer menuju nukleotida membentuk uridin difosfo-galaktosa (UDPGalaktosa), dimana pada waktu yang bersamaan, glukosa-1-fosfat akan dibebaskan. Enzim yang mengkatalisa reaksi ini disebut fosfo-galaktosa uridil tranferase atau disingkat P-Gal transferase.



Pada reaksi yang ketiga, 2 nukleotida uridin akan saling dirubah, dimana hal ini belum sepenuhnya dimengerti. Nukleotida difosforidin (DPN) adalah kofaktor untuk reaksi ini dan gula 4-keto sebagai perantaranya. Enzim yang terlibat dalam mekanisme reaksi ini disebut UDPGalaktosa-4-epimerase.



Jalur metabolik glukosa normal



Gambaran potongan hepar menunjukkan fibrosis periportal dengan peningkatan duktus bilier.

Vakuola besar dan jernih merepresentasikan deposit lemak intrasel.

Sebagai akibat akumulasi dari galaktosa, secara biokimia akan terjadi 2 jalur reaksi yang sangat berperan dalam timbulnya gejala pada pasien dengan galaktosemia. Reaksi tersebut antara lain :

1. Reduksi menjadi galaktitol

Pada pasien galaktosemia, akumulasi dari galaktosa akan menjadi substrat bagi enzim yang mengkatalisa jalur polyol pada metabolisme karbohidrat. Reaksi pertama pada jalur ini adalah reduksi aldose, jenis gula dimana galaktosa termasuk di dalamnya, menjadi gula alkohol. Data terbaru memperkirakan bahwa aldose reduktase merupakan enzim yang bertanggung jawab pada tahap pertama reaksi ini. Aldose reduktase akan merubah glukosa menjadi bentuk gula alkohol yaitu galaktitol. Akan tetapi galaktitol ini tidak dapat digunakan oleh enzim untuk jalur polyol selanjutnya, yaitu polyol dehidrogenase. Akibatnya galaktitol akan menumpuk di jaringan tubuh dan diekskresikan melalui urine. Akumulasi galaktitol inilah yang akan menyebabkan berbagai macam gejala negative pada penderita galaktosemia dan konsentrasi yang tinggi sering didapatkan pada penderita galaktosemia klasik (defisiensi GALT), defisiensi GALK maupun defisiensi epimerase.

2. Oksidasi menjadi galaktonat

Akumulasi galaktosa juga dapat menyebabkan terjadinya reaksi alternative, yaitu reaksi oksidasi menjadi galaktonat. Mekanisme bagaimana terjadinya galaktonat ini masih belum diketahui dengan pasti. Akan tetapi studi terbaru memperkirakan bahwa enzim galaktose dehidrogenase berperan dalam mengubah galaktosa menjadi galaktonolakton., yang akan dirubah secara spontan menjadi galaktonat. Sekali terbentuk galaktonat akan langsung memasuki jalur pentose fosfat. Reaksi oksidasi ini merupakan reaksi alternatif dalam metabolisme galaktosa, dimana menyediakan akumulasi produk galaktosa yang lebih tidak berbahaya dibandingkan dengan akumulasi galaktitol.

Galactitol (lens)
Myo inositol (synaptosome)
Galactose-1-p (ATP trap)
UDP-galactose (galactoproteins and galactolipids)
Galactose containing glycoproteins
Abnormal galactoconjugate
Abnormal FSH carbohydrate antenna (missing galactose)

TINJAUAN PUSTAKA

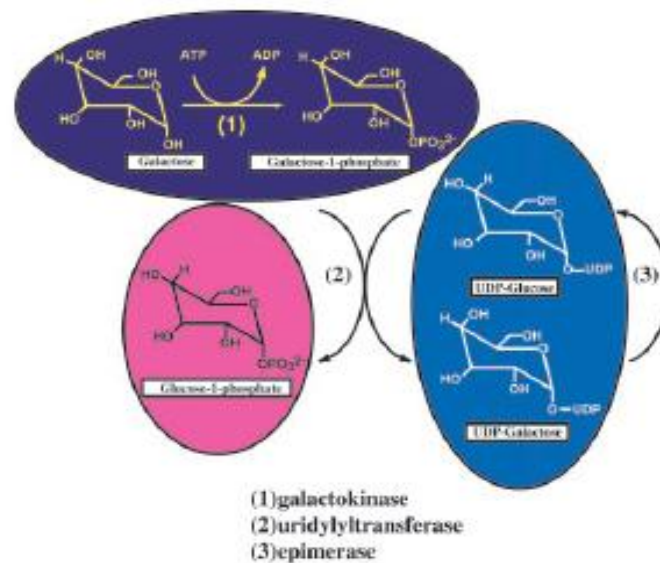
Pada bab ini kita akan lebih mendalami mengenai kelainan galaktosemia tipe 3 yaitu defisiensi epimerase, ditinjau dari analisa molekulernya. Bahasan pada bab ini diambil dari sumber jurnal “*Molecular Basis for Severe Epimerase Deficiency Galactosemia : X-Ray Structure of The Human V94M-Substituted UDP-Galactose 4-Epimerase*”

Galaktosemia adalah suatu kelainan yang diturunkan dengan karakter berupa ketidakmampuan untuk memetabolisme galaktosa. Sekalipun galaktosemia klasik merupakan hasil dari penurunan fungsi enzim kedua dari jalur Leloir, yang disebut galaktosa-1-fosfat uridiltransferase, akan tetapi ada bentuk alternatif lain dari kelainan ini yang dapat terjadi, baik defisiensi pada enzim galaktokinase maupun enzim UDP-galaktosa-4-epimerase. Salah satu dari kasus defisiensi epimerase yang parah terjadi oleh karena substitusi asam amino pada posisi 94. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa protein V94M mengalami penurunan relatif terhadap enzim tipe liar secara dominan di level V_{max} dibandingkan K_m . Untuk mengetahui konsekuensi molekuler terhadap mutasi pada struktur enzim 3 dimensi, maka struktur V94M yang mensubstitusi kompleks epimerase manusia ditambahkan NADH dan UDP-glukosa, UDP-galaktosa, UDP-GlcNAc, atau UDP-GalNAc. Pada enzim tipe liar sisi rantai hidrofobik Val₉₄ dikumpulkan dekat dengan grup aromatik dari katalitik Tyr₁₅₇ dan berperan sebagai “pagar” molekuler untuk membatasi rotasi bagian glikosil dari UDP-substrat gula di dalam sisi aktif. Efek bersih dari substitusi V94M adalah pembukaan dari Ala⁹³ menuju lengkung permukaan Glu⁹⁶, yang akan menyebabkan rotasi bebas dari gula menjadi bagian ikatan yang nonproduktif.

Galaktosemia adalah suatu penyakit genetik yang jarang akan tetapi berpotensi letal yang diturunkan melalui autosomal resesif dan menyebabkan ketidakmampuan penderita untuk memetabolisir galaktosa. Manifestasi klinis termasuk retardasi intelektual, disfungsi liver, dan formasi katarak. Sekalipun defisiensi dari ketiga enzim yang terlibat dalam jalur Leloir untuk memetabolisme galaktosa dapat menyebabkan gejala galaktosemia, akan tetapi bentuk klasik dari penyakit ini berasal dari penurunan enzim kedua dari jalur tersebut, yaitu galaktosa-1-fosfat uridil-transferase.

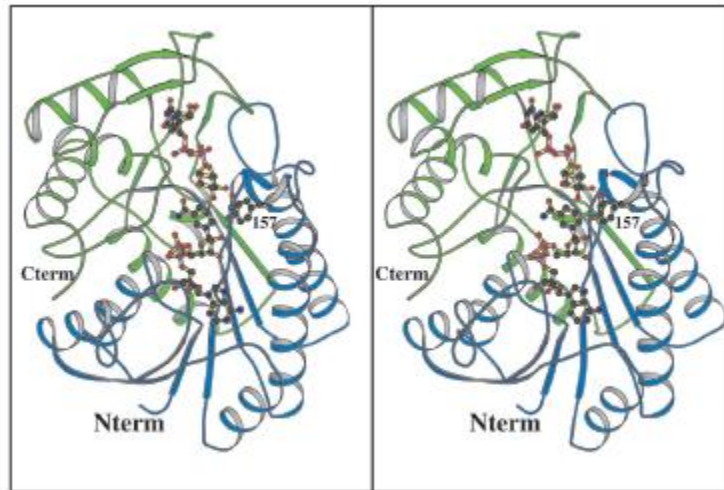
Berikut ini akan dibahas mengenai enzim ketiga dari jalur Leloir yang disebut UDP-galaktosa 4-epimerase. Enzim yang tergantung NAD⁺ ini mempunyai peran dalam memetabolisme galaktosa normal dengan cara mengkatalisir konversi antar UDP-galaktosa dan

UDP-glukosa. Menariknya, bentuk epimerase pada manusia juga menunjukkan konversi antar UDP-GlcNac dan UDP-GalNac. Tipe aktivitas seperti ini belum pernah diobservasi pada epimerase *Escheria coli*.



Dua tipe epimerase manusia yang menyebabkan galaktosemia telah diidentifikasi, yaitu perifer dan general. Bentuk perifer cukup umum terjadi di beberapa grup etnik dan biasanya bersifat benigna. Bentuk general biasanya berhubungan dengan klinis yang parah dan sangat jarang terjadi. Karakter utama bentuk paling parah dari galaktosemia defisiensi epimerase adalah mutasi homozigot yang mengkode substitusi residu methionine menjadi valine pada posisi 94. Substitusi ini menyebabkan penurunan aktivitas enzim sampai ~5% tipe liar pada UDP-galaktosa dan ~25% tipe liar pada UDP-GalNac. Protein mutan mengalami penurunan yang berhubungan dengan enzim tipe liar dengan dominasi di level v_{max} daripada di K_m .

Analisa biokimia sebelumnya terhadap epimerase dari *E.coli* telah memperkirakan bahwa mekanisme reaksi epimerase tersebut diproses melalui abstraksi hidrogen dari 4'-hidroksil grup gula oleh basa katalitik dan transfer hidrida dari C-4 gula menuju C-4 NAD, yang akan menghasilkan 4'-ketopyranose intermediate dan NADH. Rotasi dari intermediate ini diperkirakan terjadi pada sisi aktif, yang akan menyebabkan kembalinya hidrida dari NADH menuju sisi yang berlawanan dari gula. Akhir-akhir ini struktur 3 dimensi dari epimerase manusia dilengkapi dengan NADH dan UDP-glukosa dipecahkan dengan analisa kristalografik x-ray sampai resolusi 1.5 Å. Representasi pita dari 1 subunit protein homodimerik ditunjukkan pada gambar 1.

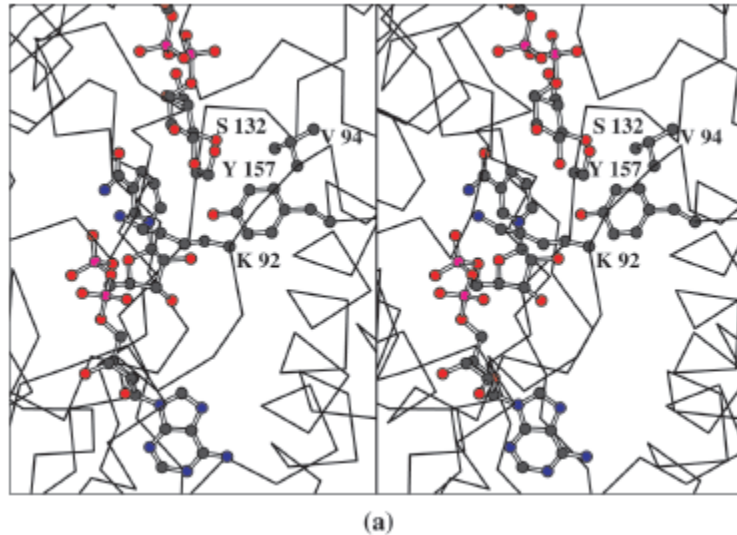


Gambar 1. Representasi pita dari 1 subunit UDP-galaktosa 4-epimerase manusia. Ikatan UDP-glukosa dan NADH ditunjukkan dalam representasi bola dan tongkat. Ser¹³² (tidak di label) dan Tyr¹⁵⁷ katalitik juga ditunjukkan.

Seperti yang dapat dilihat, lipatan keseluruhan dari enzim tersebut dapat dideskripsikan dalam 2 motif struktural : N-terminal yang ditentukan oleh Met¹-Thr¹⁸⁹ dan regio C-terminal yang dibentuk oleh Gly¹⁹⁰-Ala³⁴⁸. N-terminal mengadopsi arsitektur 3 dimensi yang disebut lipatan Rossman. Ikatan NADH dan UDP-glukosa diposisikan di dalam sisi aktif dimana C-4 gula terletak antara $\sim 3.5\text{\AA}$ dari C-4 dinukleotida. Sebagai tambahan, Oⁿ dari Tyr¹⁵⁷ dan O^y dari Ser¹³² terlokasi di 3.1\AA dan 2.4\AA , dari 4'-hidroksil grup gula. Barrier yang rendah dari ikatan hidrogen dibentuk diantara gula dan sisi rantai Ser¹³² akan memfasilitasi pemindah 4'-hidroksil hidrogen oleh rantai asam phenolic dari Tyr¹⁵⁷ dan juga transfer hidrida dari C-4 gula menuju C-4 cincin nikotinamida.

Untuk mengetahui konsekuensi molekular dari substitusi V94M pada epimerase manusia, dilakukan pengkristalan dan ditemukan struktur x-ray dari protein mutan yang dilengkapi dengan UDP-glukosa, UDP-galaktosa, UDP-GlcNac atau UDP-GalNac berdasarkan resolusi 1.5\AA . Investigasi ini memberikan pemahaman yang lebih komplisit dari konsekuensi mutasi ini terletak pada sisi aktif enzim dan menyediakan penjelasan molekular untuk pengamatan penurunan fungsi enzim.

Pada investigasi x-ray yang dipresentasikan ini, 4 bentuk kristal yang berbeda dari enzim V94M dipersiapkan, diberi nama sesuai kompleks protein dengan NADH dan ikatan berikut ini : UDP-glukosa, UDP-galaktosa, UDP-GlcNac atau UDP-GalNac. Semua struktur tersebut diberi resolusi 1.5\AA . Lokasi relatif dari mutasi galaktosemik pada sisi aktif enzim asli dapat dilohat pada gambar 2a.

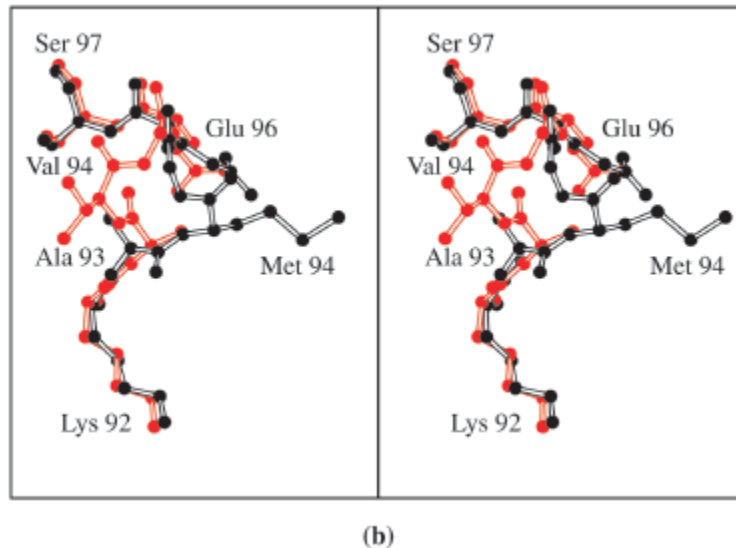


Gambar 2 a. Lokasi mutasi V94M yang menyebabkan galaktosemia defisiensi epimerase parah.

Lokasi relatif pada posisi 94 dari sisi aktif enzim tipe liar.

Seperti yang telah diperkirakan, gangguan struktur utama disebabkan oleh karena substitusi V94M yang terjadi pada lengkung helikal yang ditentukan oleh Ala⁹³ sampai Glu⁹⁶, yang menyambungkan pita β keempat menuju α -Heliks mayor keempat dari lipatan Rossmann. Perubahan pada struktur lengkung ini serupa pada semua model protein V94M yang telah dijelaskan dan tidak tergantung identitas ikatan gula pada sisi aktif. Pada enzim tipe liar, sisi rantai Val⁹⁴ yang mengarah menuju sisi aktif dan terletak pada $\sim 3.5\text{\AA}$ dari Tyr¹⁵⁷ katalitik. Sebagai tambahan, oksigen karbonil Val⁹⁴ membentuk ikatan hidrogen dengan sisi rantai grup hidroksil Ser⁹⁷, yang lebih jauh lagi berperan untuk mempererat rantai polipeptida bersebelahan dengan kantong ikatan UDP-gula. Lengkung ini pada enzim tipe liar diperintahkan dengan baik dengan faktor temperatur rata-rata 22\AA^2 untuk semua atom yang terletak antara Ala⁹³ dan Glu⁹⁶. Faktor temperatur untuk kompleks protein V94M-NADH-UDP-gula secara signifikan lebih tinggi yaitu $\sim 77\text{\AA}^2$.

Superposisi dari rantai polipeptida yang dekat dengan residu 94 pada enzim tipe liar dan protein V94M yang dilengkapi dengan UDP-galaktosa ditunjukkan pada gambar 2b.

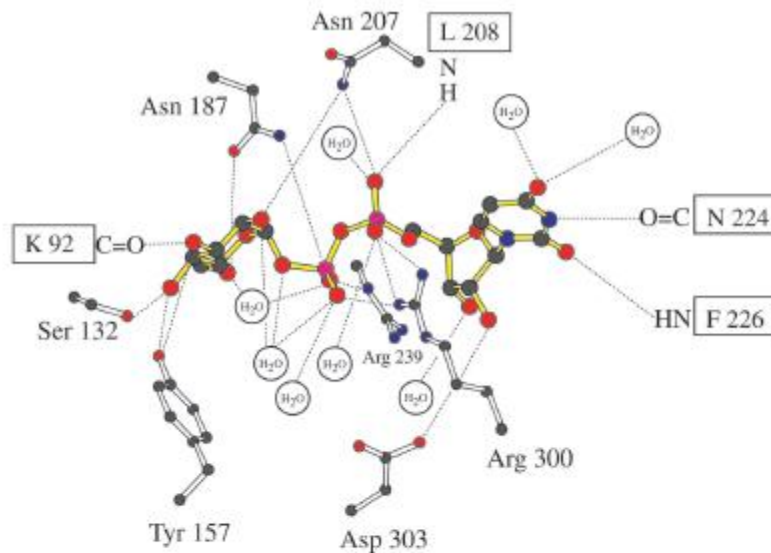


Gambar 2 b. Lokasi mutasi V94M yang menyebabkan galaktosemia defisiensi epimerase parah.

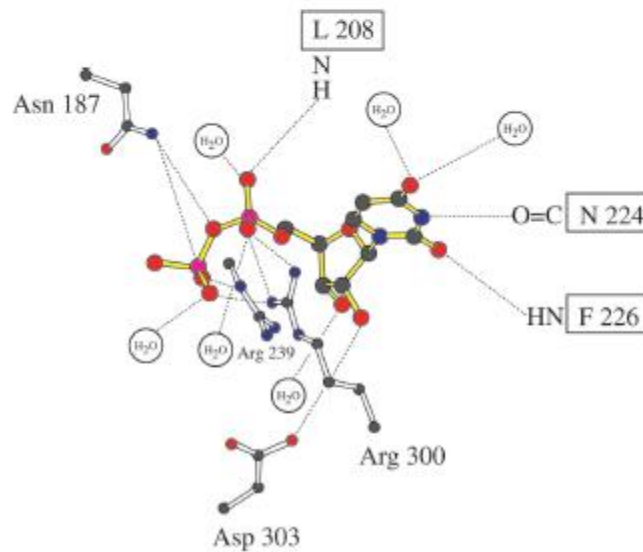
Superposisi dari tipe liar dan rantai polipeptida V94M dekat dengan mutasi.

Mutasi pada posisi 94 menyebabkan perubahan yang signifikan pada sudut dihedral dari residu alanin. Secara spesifik, pada enzim tipe liar Ala⁹³ mengadopsi sudut Φ dan Ψ sekitar -82 dan 106° , dimana pada protein V94M, sudutnya sekitar -124 dan 148° . Sebagai hasil dari perubahan ini pada sudut torsional, sisi rantai Met⁹⁴ pada protein mutan meluas menuju larutan dan ikatan hidrogen antara oksigen karbonil dari residu 94 dan O ^{γ} dari Ser⁹⁷ tidak lagi tampak. Bila lengkung di antara Ala⁹³ dan Glu⁹⁶ mengadopsi konformasi tipe liar pada protein V94M, sisi rantai Met⁹⁴ yang lebih besar tidak dapat diakomodasi pada sisi aktif tanpa *clashing* sterik yang signifikan. Hal ini menjelaskan bagian perubahan yang dramatis pada konformasi dimulai pada posisi 93.

Efek bersih dari gangguan 3 dimensi ini adalah pembukaan sisi aktif yang akan menyebabkan rotasi bebas dari gula. Akan tetapi gula dari struktur V94M yang dilengkapi dengan UDP-glukosa atau UDP-galaktosa menyebabkan konformasi multipel yang tidak dapat ditentukan. Sehingga tidaklah mungkin untuk menjelaskan secara detail interaksi karbohidrat/protein pada 2 struktur ini. Akan tetapi, dapat dibandingkan interaksi antara protein dan UDP pada tipe liar dan protein V94M dengan ikatannya terhadap UDP-glukosa maupun UDP-galaktosa. Interaksi ikatan hidrogen yang potensial diamati di antara enzim tipe liar dan substrat dijelaskan pada gambar 3a, sementara kompleks V94M-NADH-UDP-glukosa ditunjukkan pada gambar 3b.



(a)



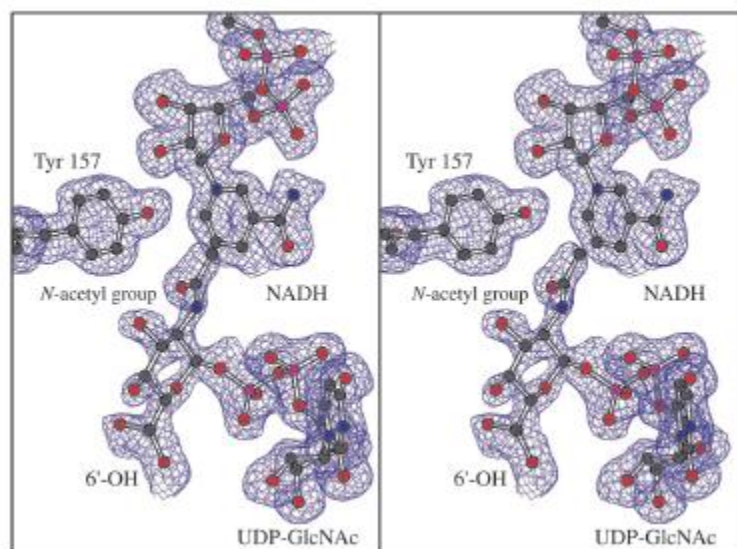
(b)

Gambar 3. Perbandingan pola ikatan hidrogen di sekitar UDP ketika terikat dengan enzim tipe liar dan protein V94M. Interaksi elektrostatis yang mungkin antara enzim asli dan ligand UDP-glukosa digambarkan dalam bentuk *dashed line* (a). UDP-glukosa ditandai dengan ikatan warna kuning untuk memperjelas. *Dashed line* menunjukkan jarak yang setara atau kurang dari 3.2Å. interaksi antara protein V94M dan UDP (pada model V94M-NADH-UDP-glukosa) ditunjukkan pada (b).

Sisi rantai membentuk ikatan hidrogen dengan UDP-glukosa pada protein tipe liar, termasuk Ser¹³², Tyr¹⁵⁷, Asn¹⁸⁷, Asn²⁰⁷, Arg²³⁹, Asp³⁰³, dan Arg³⁰⁰. Hanya Ser¹³² dan Tyr¹⁵⁷ yang satu-

satunya berinteraksi dengan bagian karbohidrat. Semua sisi rantai lainnya terutama terlibat dalam ikatan dengan UDP. Seperti yang terlihat dalam gambar 3a, cincin urasil dari UDP-glukosa terikat pada enzim asli melalui grup karbonil Asn²²⁴ dan grup peptida NH dari Phe²²⁶. Tambahan 2 molekul air akan menjembatani grup karbonil C-4 dari protein basa. Interaksi ini juga diamati di berbagai model protein mutan V94M (gambar 3b). Pada protein tipe liar, 2'-3' grup hidroksil dari uridin ribosa akan mengikat hidrogen pada grup karboksilat Asp³⁰³ dan 1 buah molekul air. Grup guanidinium dari Arg³⁰⁰ berinteraksi dengan α dan β fosforil oksigen UDP ketika terikat dengan enzim tipe liar, saat sisi rantai Arg²³⁹ membentuk suatu interaksi elektrostatik dengan β -fosforil oksigen. Interaksi yang serupa diamati pada enzim V94M seperti yang terlihat pada gambar 3b. Satu-satunya perbedaan yang signifikan di antara enzim tipe liar dan protein V94M terjadi pada glukosa. Pada enzim tipe liar, glukosa terikat secara ketat pada tempatnya oleh karena interaksi dengan sisi rantai Ser¹³² dan Tyr¹⁵⁷ dan karboksil oksigen dari Lys⁹², yang terletak di lengkung yang mengandung mutasi V94M. Interaksi ini tampaknya hilang pada protein mutan dengan ikatan UDP-glukosa atau UDP-galaktosa berdasarkan rotasi bebas grup glikosil pada sisi aktif. Perubahan yang terbatas pada K_m yang diobservasi antara enzim tipe liar dan protein V94M merupakan fungsi fakta bahwa bagian nukleotida dari substrat UDP-gula menyediakan sebagian besar interaksi ikatan.

Tidak seperti yang diobservasi pada kompleks protein V94M-NADH-UDP-Glukosa atau pada protein V94M-NADH-UDP-Galaktosa, baik terikat dengan UDP-ClcNac atau UDP-GalNac, terlihat dalam densitas elektron pada gambar 4.

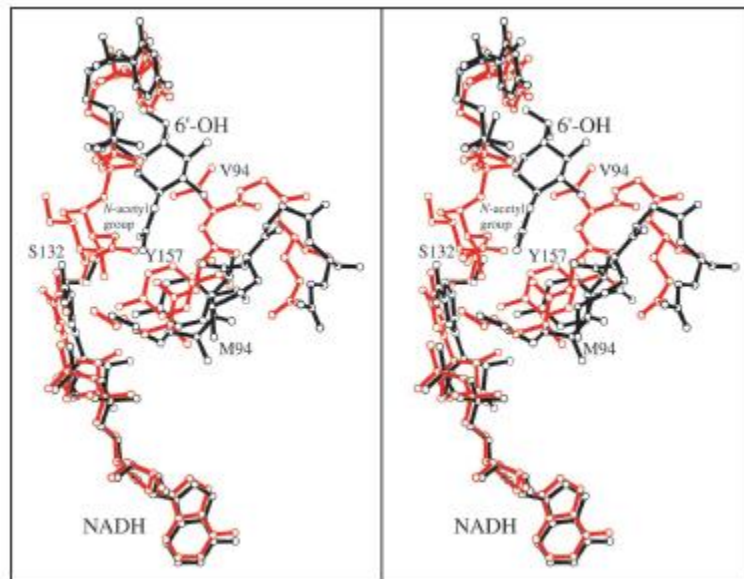


Gambar 4. Densitas elektron pada daerah yang mengelilingi UDP-GlcNac yang mengikat kantong.

Perhatikan bahwa grup 6'-hidroksil dari N-asetilglukosamin mengambil 2 konformasi dan bahwa gula terotasi menjauh dari cincin nikotinamida dari NADH. Densitas elektron residual pada gambar dikalkulasi dengan koefisien ($F_o - F_c$) memperkirakan bahwa setiap densitas elektron residual pada gula-gula ini mengambil konformasi alternatif pada tempat yang lebih rendah. Oleh karena kualitas densitas elektron residual, tidak mungkin secara acak meniru konformasi alternatif ini menjadi densitas elektron.

Menariknya, gambar densitas elektron yang mengkalkulasi enzim V94M yang dikristalkan pada keberadaan UDP-GalNac secara jelas dijelaskan bahwa ligan dialihkan menjadi UDP-GlcNac. Hasil ini mengingatkan pada epimerase yang diobservasi pada *E.coli*. Semua percobaan ditujukan untuk mempersiapkan kegagalan kompleks enzim bakteri dengan kegagalan pada UDP-galaktosa. Percobaan ini juga termasuk reduksi enzim dengan dimetilemine/borane pada keberadaan UDP-galaktosa, UDP, UMR atau TMP dan perubahan yang mengikuti nukleotida ini dengan UDP-galaktosa. Pada setiap kasus, gambaran densitas elektron selalu mengindikasikan keberadaan UDP-glukosa pada sisi aktif. Secara jelas, UDP-glukosa terikat lebih erat terhadap epimerase di kompleks yang gagal, dan sekalipun enzim telah dikurangi dengan dimetilamine/borane, aktivitas residual yang aktif tetap mengubah UDP-galaktosa menjadi UDP-glukosa. Fenomena ini terjadi pada kasus V94M yang mensubstitusi epimerase pada manusia dengan ikatan pada UDP-GalNac.

Struktur 3 dimensi epimerase tipe liar pada manusia dengan ikatan NADH dan UDP-GlcNac dapat dipecahkan dengan resolusi 1.5Å dan ditunjukkan bahwa untuk mengakomodasi tambahan grup N-asetil pada posisi C-2 gula, sisi rantai Asn²⁰⁷ berotasi menuju bagian dalam protein dan berinteraksi dengan Glu¹⁹⁹. Pada gambar 5 ditunjukkan superposisi regio sisi aktif tipe liar dan protein V94M yang terikat dengan UDP-GlcNac.



Gambar 5. Superposisi dari regio yang dekat dengan sisi aktif untuk kompleks menggagalkan kompleks enzim tipe liar dan protein V94M dengan ikatan UDP-GlcNac. Tipe liar dan protein V94M digambarkan sebagai warna merah dan hitam. Perhatikan bahwa rotasi yang signifikan dari N-asetilglukosamin keluar dari kantong sisi aktif pada protein V94M.

Seperti yang dapat dilihat, pada bentuk V94M yang disubstitusi, grup gula dari ligan berotasi keluar dari kantong dan menuju posisi 94. Tipe rotasi ini diblokir pada enzim asli karena sisi rantai Val⁹⁴. Pada enzim tipe liar, jarak antara C-4 dari ligan UDP-GlcNac dan C-4 cincin nikotinamida dari NADH adalah 3.0Å. Jarak pada model protein V94M adalah 9.4Å. Grup 4'-hidroksil dari gula pada enzim tipe liar terletak pada 2.8Å dari O^γ dari Ser¹³² dan 3.0Å dari Oⁿ dari Tyr¹⁵⁷. Berdasarkan rotasi drastik dari gula pada kantong sisi aktif, jarak ini pada kompleks protein V94M adalah 9.5Å dan 10.2Å. Hidrogen kunci mengikat antara ligan dari grup N-asetilglukosamin dan enzim tipe liar terjadi si antara sisi rantai Asn¹⁸⁷ dan 6'-OH dari gula, di antara Ser¹³² dan Tyr¹⁵⁷ dan 4'-OH dari gula. Dan akhirnya, di antara grup karbonil Lys⁹² dan 3'-OH dari karbohidrat. Interaksi ini secara lengkap hilang pada enzim V94M dengan ikatan UDP-GlcNac, dimana grup hidroksil secara sederhana membentuk ikatan hidrogen dengan molekul larutan.

KESIMPULAN

Studi x-ray yang telah dijelaskan pada Bab Tinjauan Pustaka telah memberikan pemahaman 3 dimensi mengenai galaktosemia defisiensi epimerase yang parah. Pada enzim normal, rantai hidrofobik dari Val⁹⁴ merupakan “*molecular fence*” untuk mencegah rotasi gula keluar dari kantong sisi aktif, sehingga akan mencegah ikatan yang non-produktif. Selama substitusi Val⁹⁴ dengan Methionine, regio lengkung menghubungkan pita β keempat menuju α -heliks keempat dari lipatan Rossmann sehingga menjadi tidak teratur, menyebabkan konformasi multiple dan secara efektif membuka ikatan gula dengan kantong yang menyebabkan rotasi bebas dari gula pada sisi aktif dan/atau ikatan dengan substrat non-produktif. Tidaklah mengejutkan bahwa mutasi V94M memberikan efek terhadap V_{\max} secara lebih signifikan dibandingkan dengan K_m . Sebagian besar interaksi ikatan untuk substrat UDP-gula terjadi antara protein dan nukleotida dan hal ini dirusak oleh mutasi. Penggantian V94M menyebabkan bagian karbohidrat dari UDP-gula berotasi secara bebas sehingga membatasi waktu ligand terikat dengan mode produktif dekat dengan O ^{γ} dari Ser¹³² dan Oⁿ dari Tyr¹⁵⁷. Demikian V_{\max} terpengaruh dengan parah.