



Universitat Ramon Llull

TESI DOCTORAL

Títol “Mecanisme enzimàtic de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*: estudis cinètics en estat estacionari i preestacionari”

Realitzada per Mireia Abel Lluch

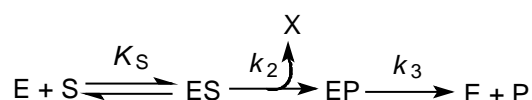
en el Centre Escola Tècnica Superior IQS

i en el Departament Bioenginyeria

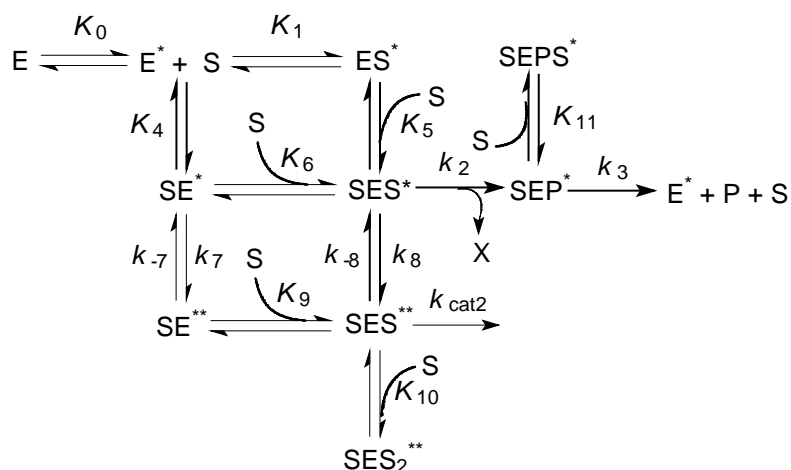
Dirigida per Dr. Antoni Planas Sauter

Sumari

Les glicosidases que hidrolitzen els substrats amb retenció de configuració segueixen un mecanisme general en què després d'una primera etapa d'associació enzim-lligand s'encadenen dues etapes catalítiques que porten a la hidròlisi del substrat conservant la configuració del carboni anomèric en el nou extrem generat.



En el present treball es comprova a través d'estudis mecanístics, principalment estudis en estat preestacionari i anàlisis de Hammett, que amb aquest mecanisme tan senzill no es pot descriure correctament l'activitat catalítica de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, i es proposa el mecanisme que es mostra a continuació:



on els complexos enzim-substrat adopten dues conformacions productives (SES^* i SES^{**}) i on el balanç entre aquestes dues conformacions en funció del substrat explica els diferents comportaments cinètics en estat estacionari i preestacionari.

Un estudi en profunditat sobre la importància que exerceix la interacció entre l'enzim i l'hidroxil a C2 de la unitat de glucopiranososa que ocupa el subseti -1 demostra que en el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* aquesta interacció no juga el paper rellevant que s'ha observat en altres β -glicosidases que actuen amb retenció de configuració.

L'estudi de la reacció d'hidratació del glical G4G3G' catalitzada per la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* permet proposar que hi ha un canvi en el residu que fa el paper d'àcid general. De manera que es proposa que l'Asp136 que en la reacció d'hidròlisi de substrats ajuda al posicionament dels residus catalítics i juga un paper en la regulació dels seus pK_a , és el residu que fa d'àcid general en la reacció d'hidratació de glicals.

Abreviatures i acrònims

4 Å MS	tamisos moleculars de 4 Å
Abs	absorbància
AcOEt	acetat d'etil
Ac ₂ O	anhídrid acètic
AMP	adenosín monofosfat
ADN (DNA)	àcid desoxirribonuclèic
ADNasa	desoxirribonucleasa
A.E.	anàlisi elemental quantitativa
<i>Amp^r</i>	gen de resistència a ampicil·lina
aq.	aquós
aq., sat.	aquós saturat
Ar	grup aril
ARN	àcid ribonuclèic
ARNasa	ribonucleasa
ArOH	compost fenòlic genèric
atm.	atmosfera
ATP	adenosín trifosfat
b	bases
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
BF ₃ ·EtOEt	trifluorur de bor eterat
Bn	benzil
BrP	bromofenol
BSA	albúmina sèrica bovina
BTEBA	bromur de trietilbenzilamoni
But	butil
But ₄ NOT _f	triflat de tetrabutilamoni
(c)	concentrat
CBD	<i>Cellulose Binding Domain</i> . Centre d'unió de cel·lulosa
CBM	<i>Carbohydrate Binding Module</i> . Mòdul no-catalític d'unió de sacàrids associat a glicosil hidrolases
c.c.f.	cromatografia de capa fina
CM-Sepharose	carboximetil sefarosa
COSY	<i>COrelated Spectroscopy</i>
Cp ₂ TiCl	clorur de <i>bis</i> (ciclopentadienil) titani(III)
Cy	ciclohexà
d	doblet
DABCO	1,4-diazabicciclo[2.2.2]octà
dd	doblet de dobles
ddd	doblet de dobles de dobles
ddNTP	5'-trifosfat de 2',3'-didesoxiribonucleòsid
DEAD	azodicarboxilat de dietil
DEAE	dietilaminoetil
DEPT	<i>Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
dG	desoxiglucopiranosa
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfòxid
DNP	dinitrofenil

DNS	àcid 3,5-dinitrosalicílic
dNTP	5'-trifosfat de 2'-desoxiribonucleòsid
DTT	ditiotreitòl
E.C.	<i>Enzyme Commission (International Union of Biochemistry)</i>
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
em.	emissió
Epo	epòxid
EtOEt	èter dietílic
EtOH	etanol
exc.	excitació
F	fluorescència
FDNB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzè
<i>FUP</i>	<i>Forward Universal Primer</i> . Encebador universal que hibrida amb la cadena codificant
G, Glcp	glucopiranososa
G'	1,5-anhidro-2-desoxi-D- <i>arabino</i> -hex-1-enitol (glucal)
(g)	gasós
Gal	galactosa
GlcNAc	glucosamina
gem	geminal
HAcO	àcid acètic
HETCOR	<i>HETeronuclear CORrelation</i>
HPLC	cromatografia líquida d'alta pressió
I	força iònica
IQS	Institut Químic de Sarrià
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosid
IR	infraroig
IUBMB	Unió Internacional de Bioquímica i Biologia Molecular
KAcO	acetat potàsic
<i>lac</i>	operó induïble implicat en el metabolisme de la lactosa en <i>Escherichia coli</i>
<i>LacZ</i>	gen de la β -galactosidasa Z d' <i>Escherichia coli</i>
LA-PCR	PCR llarga i precisa
LB	medi de cultiu de Luria-Bertani
LBHB	<i>Low Barrier Hydrogen Bond</i>
LFER	<i>Linear Free Energy Relationship</i> . Relació lineal d'energia lliure
m	multiplet
M9	medi de cultiu mínim sense aminoàcids
MeCOMe	acetona
MeOH	metanol
MOPS	àcid 3-(<i>N</i> -morfolino)-propanosulfònic
MU	4'-metilumbel·liferil
NaAcO	acetat sòdic
NaHMDS	hexametildisilazanat sòdic
NaOMe	metòxid sòdic
NH ₂ NH ₂ ·HAcO	acetat d'hidrazina
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NP	nitrofenil
Nu	nucleòfil

ON	<i>Overnight</i> . 12 hores
oriC	origen de replicació
P	fenil
pO ₂	pressió d'O ₂
pb	parells de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> . Reacció en cadena de la polimerasa
p.f.	punt de fusió
Ph	fenil
pI	punt isoelèctric
PMSF	fluorur de fenilmetilsulfonil
ppm	parts per milió
PTC	<i>Phase Transfer Catalysis</i> . Catàlisi per transferència de fase
Py	piridina
q	quadruplet
RBS	<i>Ribosome Binding Site</i> . Punt d'ancoratge del ribosoma.
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear
RP	<i>Reverse Phase</i> . Fase reversa
RUP	<i>Reverse Universal Primer</i> . Encebador universal que hibrida amb la cadena no-codificant
s	singlet
sa	senyal ample
sat.	saturat
SB	medi de cultiu d'Okita <i>et al.</i>
SDM	<i>Site Directed Mutagenesis</i> . Mutagènesi dirigida.
SDS	dodecil sulfat sòdic
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-PoliAcrylamide Gel Electrophoresis</i> . Electroforesi desnaturalitzant en gel de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic
t	triplet
t.a.	temperatura ambient
TAPS	àcid <i>N</i> -[Tris(hidroximetil)metil]-3-aminopropanosulfònic
TBABF ₄	tetrafluoroborat de tetrabutilamoni
TBDPS	<i>tert</i> -butildifenilsilil
TE	tampó tris(hidroximetil)-aminometà
T _{eb}	temperatura d'ebullició
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametilendiamina
TfOH	àcid trifluorometanosulfònic (àcid triflic)
T _H	temperatura d'hibridació
THF	tetrahidrofurà
TMS	tetrametilsilà
TMSI	iodotrimetilsilà
TMSOTf	triflat de trimetilsilil
t _r	temps de retenció
Tris	tris(hidroximetil)-aminometà
TSPNa	3-(trimetilsilil)-2,2,3,3-tetradeuteropropionat sòdic
u	unitats d'activitat enzimàtica
uAbs	unitats d'absorbància
UV	ultraviolat
VIS (vis)	visible
wt	<i>wild type</i> . Enzim salvatge

Abreviatures per als aminoàcids codificats genèticament

Ala (A)	Alanina	Leu (L)	Leucina
Arg (R)	Arginina	Lis (K)	Lisina
Asn (N)	Asparagina	Met (M)	Metionina
Asp (D)	Aspartat	Phe (F)	Fenilalanina
Cys (C)	Cisteïna	Pro (P)	Prolina
Gln (Q)	Glutamina	Ser (S)	Serina
Glu (E)	Glutamat	Thr (T)	Treonina
Gly (G)	Glicina	Trp (W)	Triptòfan
His (H)	Histidina	Tyr (Y)	Tirosina
Ile (I)	Isoleucina	Val (V)	Valina

Abreviatures per a les bases d'ADN

A	Adenina	G	Guanina
C	Citosina	T	Timina

Abreviatures per a glicòsids

G-Ar	Aril β -D-glucopiranosid
G- α OMe	Metil α -D-glucopiranosid
G3G-MU	4'-metilumbel·liferil O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosid
G4G4G	O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranososa (Cel·lotriososa)
G4G4G'	O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-1,5-anhidro-2-desoxi-D- <i>arabino</i> -hex-1-enitol
G4G3G	O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranososa
G4G3G'	O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-1,5-anhidro-2-desoxi-D- <i>arabino</i> -hex-1-enitol
(G4G3G') _{Ac}	O -(2,3,4,6-tetra- O -acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)- O -(2,3,6-tri- O -acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di- O -acetil-1,5-anhidro-2-desoxi-D- <i>arabino</i> -hex-1-enitol
G4G3G-Ar	Aril O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosid
G4G3(2dG)-4NP	4'-nitrofenil O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-desoxi- β -D-glucopiranosid
Gal4G3G- α -F	Fluorur d' O - β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-glucopiranosil
G4G4G3G	O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranososa
(G4G4G3G') _{Ac}	O -(2,3,4,6-tetra- O -acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)- O -(2,3,6-tri- O -acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)- O -(2,3,6-tri- O -acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di- O -acetil-1,5-anhidro-2-desoxi-D- <i>arabino</i> -hex-1-enitol
G4G4G3G-Ar	Aril O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosid
(G4G4G3(2dG))-I	Iodur d' O -(2,3,4,6-tetra- O -acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)- O -(2,3,6-tri- O -acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)- O -(2,3,6-tri- O -acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di- O -acetil-2-desoxi- α -D-glucopiranosil
G4G4G3(2dG)-4NP	4'-nitrofenil O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-desoxi- β -D-glucopiranosid
G4G4G3(2dG)-MU	4'-metilumbel·liferil O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-desoxi- β -D-glucopiranosid
G4G3G4GOMe	Metil O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosid
G4G4G4G3G-MU	4'-metilumbel·liferil O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosid
G4G4G3G4G4G	O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranososa
G4G4G3G4G4GOMe	Metil O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosid
Gal4G4G3G4G4GOMe	Metil O - β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosid

Ar: P: fenil; **4BrP:** 4'-bromofenil; **3NP:** 3'-nitrofenil; **MU:** 4'-metilumbel·liferil; **2NP:** 2'-nitrofenil; **4NP:** 4'-nitrofenil; **3,5DNP:** 3',5'-dinitrofenil; **3,4DNP:** 3',4'-dinitrofenil; **2,3DNP:** 2',3'-dinitrofenil; **2,4-DNP:** 2',4'-dinitrofenil

Índex

Introducció

I.1.- Mecanismes bàsics d'hidròlisi enzimàtica per part de les glicosidases	3
I.2.- Classificació de les glicosidases i estructura del centre actiu	4
I.3.- Mètodes tradicionals per a l'estudi del mecanisme enzimàtic	8
I.4.- Estructura de l'intermedi de reacció i els estats de transició en la hidròlisi de glicòsids	9
I.5. Estudi del mecanisme de glicosidases a través de les estructures cristal·logràfiques de diferents complexos enzim·l·ligand	11
I.6.- 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	14
I.6.1.- Especificitat per substrat i estructura tridimensional de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	15
I.6.2.- Caracterització cinètica de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	17

Objectius 25

Discussió de Resultats

Capítol 1. Biologia molecular, expressió i purificació enzimàtica

1.1.- Obtenció dels mutants W221A, W221F, Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i> per mutagènesi dirigida	29
1.1.1.- ADN motlle emprat en l'obtenció dels mutants de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	31
1.1.2.- Encebadors emprats en l'obtenció dels mutants de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	31
1.1.3.- Obtenció del plasmidi pD6-2 dels mutants W221F, W221A i Y152A emprant el mètode amb dues etapes de PCR consecutives	33
1.1.4.- Obtenció del plasmidi pD6-2 del mutant Y152F emprant el mètode amb una única etapa de PCR	36
1.1.5.- Transformació i selecció dels clons que incorporen les 1,3-1,4- β -glucanases mutades	37
1.2.- Seqüenciació dels gens mutats de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	41
1.2.1.- Obtenció de l'ADN per a la seqüenciació	41
1.2.2.- Seqüenciació dels gens	41
1.3.- Expressió i purificació de l'enzim salvatge i els mutants obtinguts de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	42
1.3.1.- Expressió dels enzims	42
1.3.2.- Purificació dels enzims	42
1.4.- Expressió i purificació de l'enzim salvatge i el mutant C181A de la β -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	45

Capítol 2. Síntesi de substrats i anàlegs de substrat per a l'anàlisi cinètica de la 1,3-1,4- β -D-glucanasa de *Bacillus licheniformis* i de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814

2.1.- Estructura dels substrats emprats en la caracterització cinètica de glicosidases	49
2.2.- Síntesi química d'enllaços glicosídics	51
2.3.- Síntesi dels substrats cromofòrics per a les anàlisis de Hammett i caracterització cinètica de l'enzim salvatge i mutants de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	53
2.3.1.- Digestió de β -glucà d'ordi amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	54
2.3.2.- Acetilació del cru d'hidròlisi	54
2.3.3.- Síntesi dels bromurs de glicosil	55
2.3.4.- Glicosidació dels bromurs de glicosil	55
2.3.5.- Desprotecció dels glicòsids acetilats	55
2.3.6.- Síntesi del 2',4'-dinitrofenil <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosid (28)	56
2.4.- Síntesi dels substrats cromofòrics per a les anàlisis de Hammett i caracterització cinètica de l'enzim salvatge i el mutant C181A de la β -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	57
2.4.1.- Síntesi dels aril β -D-glucopiranosids 36-40	58
2.4.2.- Síntesi del 2',4'-dinitrofenil β -D-glucopiranosid (41)	59
2.5.- Síntesi de l' <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-1,5-anhidro-2-desoxi-D- <i>arabino</i> -hex-1-enitol (56)	59
2.5.1.- Obtenció del glical <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)- <i>O</i> -(2,3,6-tri- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di- <i>O</i> -acetil-1,5-anhidro-2-desoxi-D- <i>arabino</i> -hex-1-enitol (42)	59
2.5.2.- Desprotecció de glicals per- <i>O</i> -acetilats	70
2.6.- Síntesi del 4'-nitrofenil <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-desoxi- β -D-glucopiranosid (68)	71
2.6.1.- Mètodes de síntesi de 2-desoxi- β -glicòsids	71
2.6.2.- Síntesi d'aril 2-desoxi- β -glicòsids	72
2.6.3.- Síntesi del 4'-nitrofenil <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)- <i>O</i> -(2,3,6-tri- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)- <i>O</i> -(2,3,6-tri- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 3)-4,6-di- <i>O</i> -acetil-2-desoxi-D-glucopiranosid (67)	74
2.6.4.- Des- <i>O</i> -acetilació dels grups hidroxil	79
2.6.5.- Ruta final de síntesi del 4'-nitrofenil 2-desoxi- β -D-glicòsid 68	79

Capítol 3. Hidratació de glicals

3.1.- Glicals com a inhibidors i pseudosubstrats de glicosidases	81
3.2.- Hidratació de glicals per part de glicosidases	83
3.3.- Antecedents amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	87
3.4.- Requeriments	88

3.5.- Determinació de la cinètica d'hidratació del glicol G4G3G' per part de l'enzim salvatge i mutants en residus essencials del centre actiu de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	89
3.6.- Perfil de pH de la reacció d'hidratació del glicol G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	95
3.6.1.- Dependència de l'activitat enzimàtica amb el pH	95
3.6.2.- Perfil de pH per a la hidratació enzimàtica del glicol G4G3G'	95
3.7.- Conclusions	101

Capítol 4. Importància de l'hidroxil a C2 en el mecanisme enzimàtic de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

4.1.- Influència dels substituents en la hidròlisi espontània de glicòsids	103
4.2.- Influència dels substituents en la hidròlisi de glicòsids catalitzada per glicosidases	104
4.3.- Paper del residu que actua com a nucleòfil en l'estabilització de l'estat de transició	104
4.4.- Interaccions amb l'hidroxil a C2 en el cas de β -glicosidases	107
4.5.- Interaccions amb l'hidroxil a C2 en les α -glicosidases	108
4.6.- Estudi del paper de l'hidroxil a C2 per a la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	109
4.6.1.- Antecedents	112
4.6.2.- Perfil d'activitat enfront del pH de l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	112
4.6.3.- Determinació dels paràmetres cinètics de l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	118
4.6.4.- Cinètiques de reacció de l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i> amb un substrat natural de l'enzim, el β -glucà d'ordi	122
4.6.5.- Estudis d'inhibició	125
4.6.6.- Resum dels resultats d'unió obtinguts amb l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>B. licheniformis</i> amb l'inhibidor G4G3G i els substrats G4G3G-MU i β -glucà d'ordi	133
4.7.- Avaluació de la interacció que s'exerceix amb l'hidroxil a C2 a la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>B. licheniformis</i> per modificació del substrat	139
4.8.- Conclusions	145
4.9.- Consideracions mecanístiques addicionals. Segona branca en el mecanisme catalític	145

Capítol 5. Estudis mecanístics mitjançant cinètiques en estat preestacionari

5.1.- Cinètiques enzimàtiques en estat preestacionari	149
5.1.1- Unió proteïna-carbohidrat	150
5.1.2.- Determinació del mecanisme de catàlisi	150
5.2.- Cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	151

5.2.1.- Cinètiques d'unió amb el mutant E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	152
5.2.2.- Cinètiques en estat preestacionari de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i> amb diferents substrats	160
5.2.3.- Dependència de les cinètiques en estat preestacionari amb el pH	178
5.3.- Conclusions	182

Capítol 6. Anàlisi de Hammett aplicada a l'estudi mecanístic de glicosidases

6.1.- Relacions lineals d'energia lliure. Equació de Hammett i equació de Brønsted	185
6.2.- Aplicació de les relacions lineals d'energia lliure a la deducció del mecanisme enzimàtic	186
6.3.- Anàlisis de Hammett aplicades a glicosil hidrolases. Interpretació dels resultats obtinguts en una anàlisi de Hammett	187
6.4.- Estudi del mecanisme enzimàtic de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	193
6.4.1.- Antecedents	193
6.4.2.- Anàlisis de Hammett de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i> a 30 °C	194
6.4.3.- Anàlisis de Hammett a diferents pH	202
6.4.4. Efectes de la mutació del residu W221 en l'entorn del residu àcid/base general: pK _a cinètics i anàlisis de Hammett	206
6.4.5.- Cinètiques en estat preestacionari del mutant W221A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	212
6.4.6. Interpretació de les anàlisis de Hammett per als mutants W221A i W221F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i> en base a un mecanisme ramificat	214
6.4.7.- Comparació de les anàlisis de Hammett entre els mutants W221F i W221A i l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	215
6.5.- Estudi mecanístic de la β -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	218
6.5.1.- Caracterització cinètica de la β -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	218
6.5.2.- Anàlisis de Hammett de la β -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	222
6.5.3.- Anàlisis de Hammett del mutant C181A de la β -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	227
6.6.- Conclusions	230
6.6.1.- 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	230
6.6.2.- β -glucosidasa de <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	231

Capítol 7. Interpretacions de les cinètiques amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

7.1.- Mecanisme catalític proposat per a la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	233
--	-----

7.2.- Canvi conformacional lligat a una regulació directa de l'activitat enzimàtica	238
7.3.- Canvi conformacional lligat a la degradació processiva de substrats polimèrics	239
7.4.- Coexistència de l'activitat hidrolítica i transglicosidasa de la 1,3-1,4- β -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i> en dues conformacions enzimàtiques diferents	241
Conclusions	247
Part experimental	251
Bibliografia	371
Apèndixs	
Apèndix 1. Cinètiques en estat preestacionari amb proteïnes que uneixen carbohidrats	
A1.1.- Concanavalina A	I
A1.2.- Glucoamilasa	III
A1.3.- Bibliografia	VIII
Apèndix 2. Deducció de paràmetres cinètics en estat preestacionari	
A2.1.- Deducció de k_{obs}	XI
A2.2.- Bibliografia	XX
Apèndix 3. Anàlisi de Hammett i glicosidases	
A3.1.- Equació de Hammett	XXI
A3.2.- Assistència àcida enfront de trencament d'enllaç glicosídic	XXII
A3.3.- Anàlisis complementàries que ajuden a la interpretació de les anàlisis de Hammett	XXIII
A3.4.- Exemples d'anàlisi de Hammett aplicades a glicosidases	XXIV
A3.4.1.- Gràfics de Hammett bifàsics en k_{cat}	XXIV
A3.4.2.- Gràfics de Hammett monofàsics en k_{cat}	XXX
A3.4.3.- Anàlisi de Hammett amb resultats no convencionals	XXXV
A3.5.- Anàlisi de Hammett aplicades a mutants de glicosidases	XLI
A3.6.- Bibliografia	XLV
Apèndix 4. Hidròlisi enzimàtica processiva de glicòsids	
A4.1.- Hidròlisi processiva de glicòsids polimèrics	XLIX
A4.2.- Estructura del centre actiu en glicosidases processives	LIV
A4.3.- Mòduls d'unió de carbohidrat	LIV
A4.4.- Bibliografia	LV

Introducció

I.1. Mecanismes bàsics d'hidròlisi enzimàtica per part de les glicosidases

La gran varietat estereoquímica dels carbohidrats unida als diferents possibles tipus d'unió que poden donar-se entre ells, fa dels oligo- i polisacàrids un grup d'una elevada biodiversitat [1], amb gran varietat de funcionalitats. Mentre que els polisacàrids poden actuar com a components d'emmagatzemament, elements estructurals (són la part integrant de la majoria d'estructures vegetals) o de reconeixement; els oligosacàrids, solen esdevenir reservoris energètics i elements de reconeixement. A més, també es troben formant part de gran nombre de glicoconjugats com són els glicolípid, glicoproteïnes o saponines. Com a conseqüència, a la natura s'han desenvolupat una gran varietat d'enzims capaços d'hidrolitzar enllaços glicosídics, les glicosidases. Aquests enzims són especialment eficients ja que l'enllaç glicosídic, i en concret, el que es dona entre dues unitats de glucosa, és l'enllaç més estable entre els biopolímers naturals [2], i les glicosidases aconseguen augments de velocitat fins a 10^{17} vegades en relació als de les respectives reaccions no catalitzades [3].

La hidròlisi enzimàtica d'enllaços glicosídics rendeix un hemiacetal sacarídic ja sigui amb la mateixa configuració anomèrica del sucre de partida (retenció de configuració) o amb la configuració oposada (inversió de configuració). Al 1953 Koshland va proposar els mecanismes bàsics per a aquests dos tipus de reacció [4], que al llarg del temps han demostrat ser els mecanismes bàsics emprats per la gran majoria de glicosidases, amb comptades excepcions [5, 6]. Les glicosidases que actuen amb inversió de configuració fan servir un mecanisme de desplaçament senzill, que té lloc a través d'un estat de transició de tipus oxocarbocatiònic, on es dona l'atac nucleofílic d'una molècula d'aigua al carboni anomèric. En aquesta etapa un dels carboxilats augmenta la nucleofília de l'aigua, mentre que l'altre assisteix en la sortida de l'aglicona amb catàlisi àcida general (figura I.1).

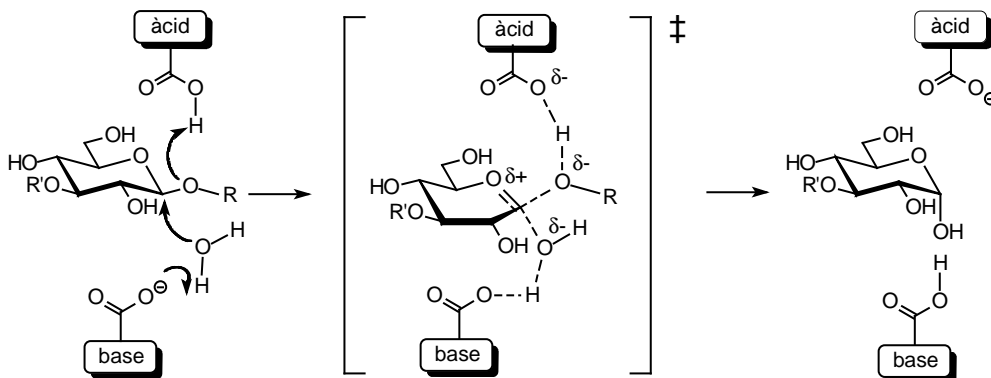


Figura I.1. Mecanisme general de reacció per a glicosidases que actuen amb inversió de configuració de l'estereoquímica del carboni anomèric.

del centre actiu [7], fa que aquesta classificació també reflecteixi similituds de centres actius (figura I.3). Així, els enzims *exo-* tendeixen a tenir centres actius en forma de butxaca, mentre que els enzims *endo-* solen tenir centres actius en forma d'escaleta que permeten un atac indiscriminat en qualsevol punt de la cadena. Apart d'aquests dos grans grups estan els enzims que degraden polisacàrids fibrosos amb pocs extrems, i que solen actuar de forma processiva, és a dir, un cop s'uneixen a la cadena polisacàridica realitzen diversos cicles catalítics abans d'alliberar el substrat. Per a aquests enzims el centre actiu presenta una estructura més tancada, en forma de túnel, per la qual el substrat va lliscant després de cada cicle catalític. El problema d'aquesta classificació es troba en la catalogació d'enzims que presenten activitats intermèdies entre el mode d'acció *endo-* i *exo-*, per exemple la cel·lulasa CenC de *Cellulomonas fimi* [9], que després de realitzar un determinat nombre de cicles catalítics alliberen el substrat, per tal d'unir un altre fragment de cadena.

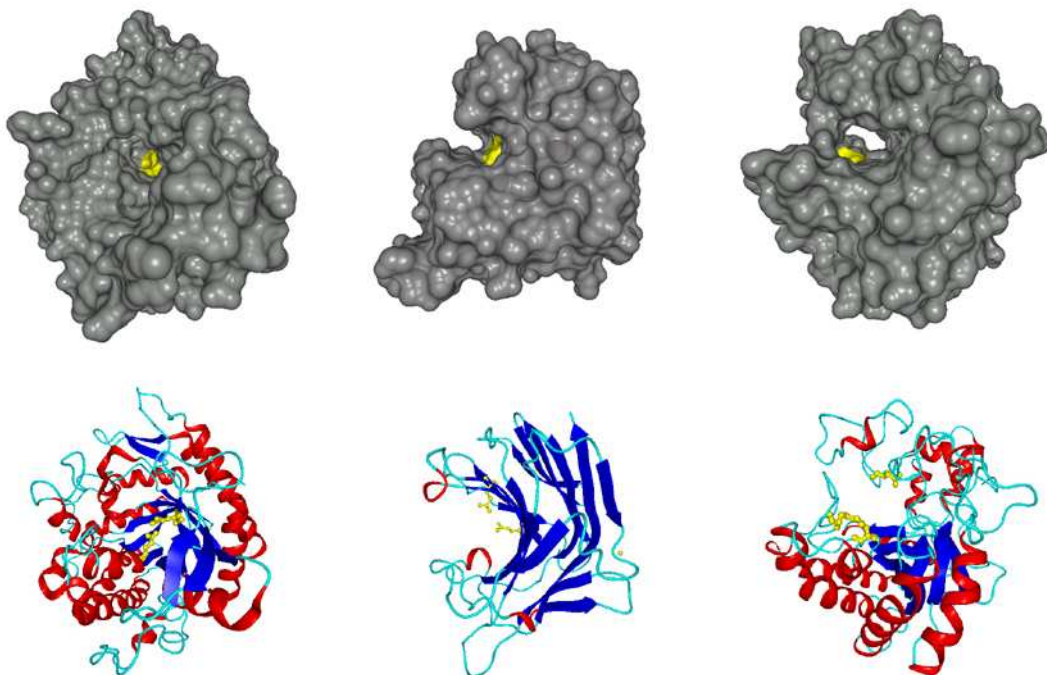


Figura I.3. Diferents representacions de les estructures tridimensionals de tres glicosidases diferents en les que els dos residus catalítics es troben colorits en groc. A dalt es mostra la representació de la superfície exclosa de dissolvent, mentre que a baix es mostra la representació de les mateixes proteïnes en funció de l'estructura secundària. La representació de l'esquerra correspon a la β -glucosidasa de *Thermus thermophilus* HB8, que té un centre actiu en forma de butxaca; la central és de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* [10], que té un centre actiu en forma d'escaleta; i la de la dreta és la de l'endoglucanasa Cel6 de *Mycobacterium tuberculosis* [11], que té un centre actiu en forma de túnel.

Les dues classificacions més elaborades es basen una, en l'especificitat per substrat de les glicosidases, i l'altra, en la seqüència d'aminoàcids de l'enzim. La classificació en base a l'especificitat per substrat se sustenta en les recomanacions de la Unió Internacional de Bioquímica i Biologia Molecular (IUBMB) i s'expressa com a número E.C. per a un enzim determinat [12]. Aquest mètode és especialment problemàtic en el cas d'enzims que presenten més d'una especificitat per substrat, i no aporta cap informació estructural o mecànica de l'enzim. La classificació basada en la similitud d'estructures primàries de les diferents glicosidases s'introdueix al 1991 [13].

Aprofitant que la seqüència aminoacídica d'una proteïna està relacionada amb la seva estructura tridimensional, i aquesta amb el mecanisme enzimàtic, aquesta classificació té capacitat predictiva, de manera que coneixent l'estructura primària d'una proteïna es pot derivar informació estructural i mecanística de la mateixa [14]. D'aquesta forma, els membres d'una mateixa família tenen estructures tridimensionals similars i comparteixen mecanisme, si bé poden tenir especificitats per substrat diferents. Aquesta classificació, que resulta ser més pràctica que l'anterior, ha anat imposant-se en el món de les glicosidases. Actualment consta de 107 famílies, organitzades en 14 clans en base a la similitud de seqüència tridimensional (figura I.5), i ha estès el seu camp d'aplicació per tal d'incloure glicosil transferases, liases de polisacàrids i esterases de carbohidrats, i més enllà de proteïnes amb activitat enzimàtica, també s'ha creat una classificació per a mòduls d'unió de carbohidrats. A internet es troba un servidor contínuament actualitzat en què es facilita la informació referent a aquestes famílies (<http://www.cazy.org/>).

Estructura del centre actiu en subsetis

Dins del centre actiu de l'enzim els diferents grups de residus que interaccionen amb cada unitat de sucre es diu que conformen els diferents subsetis d'unió de carbohidrat. En funció de l'especificitat per substrat i el mode d'acció de cada glicosidasa els centres actius comprenen un nombre diferent de subsetis. La nomenclatura dels mateixos se centra en el punt on se situen els dos residus catalítics, que correspon amb el punt d'hidròlisi de l'enllaç glicosídic [15, 16]. Els subsetis que uneixen unitats de carbohidrat cap a l'extrem reductor de l'oligosacàrid s'anomenen amb numeració creixent a mesura que s'allunyen del punt de tall, i precedits del signe positiu. Per contra, els subsetis que uneixen unitats de carbohidrat cap a l'extrem no-reductor de l'oligosacàrid s'anomenen igualment amb numeració creixent a partir del punt d'hidròlisi, però en aquest cas, precedits d'un signe negatiu (figura I.4).

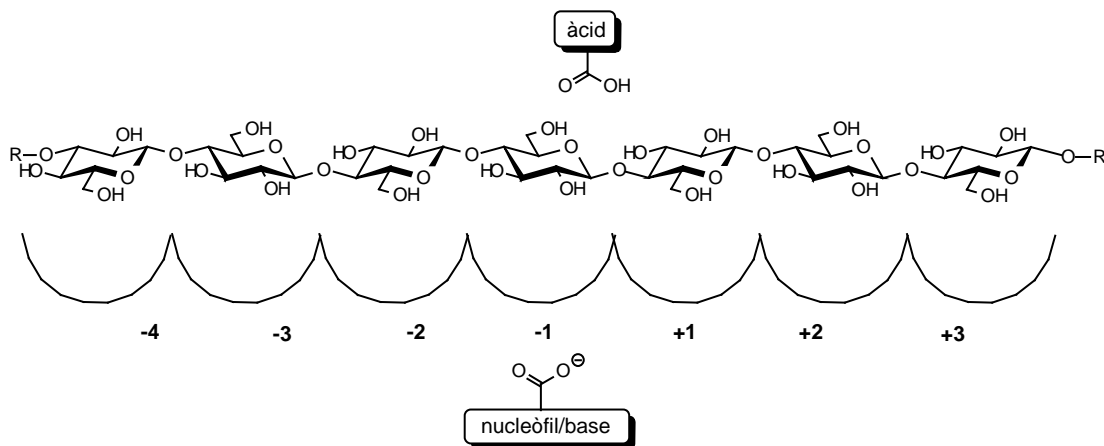


Figura I.4. Estructura en subsetis del centre actiu d'una glicosidasa.

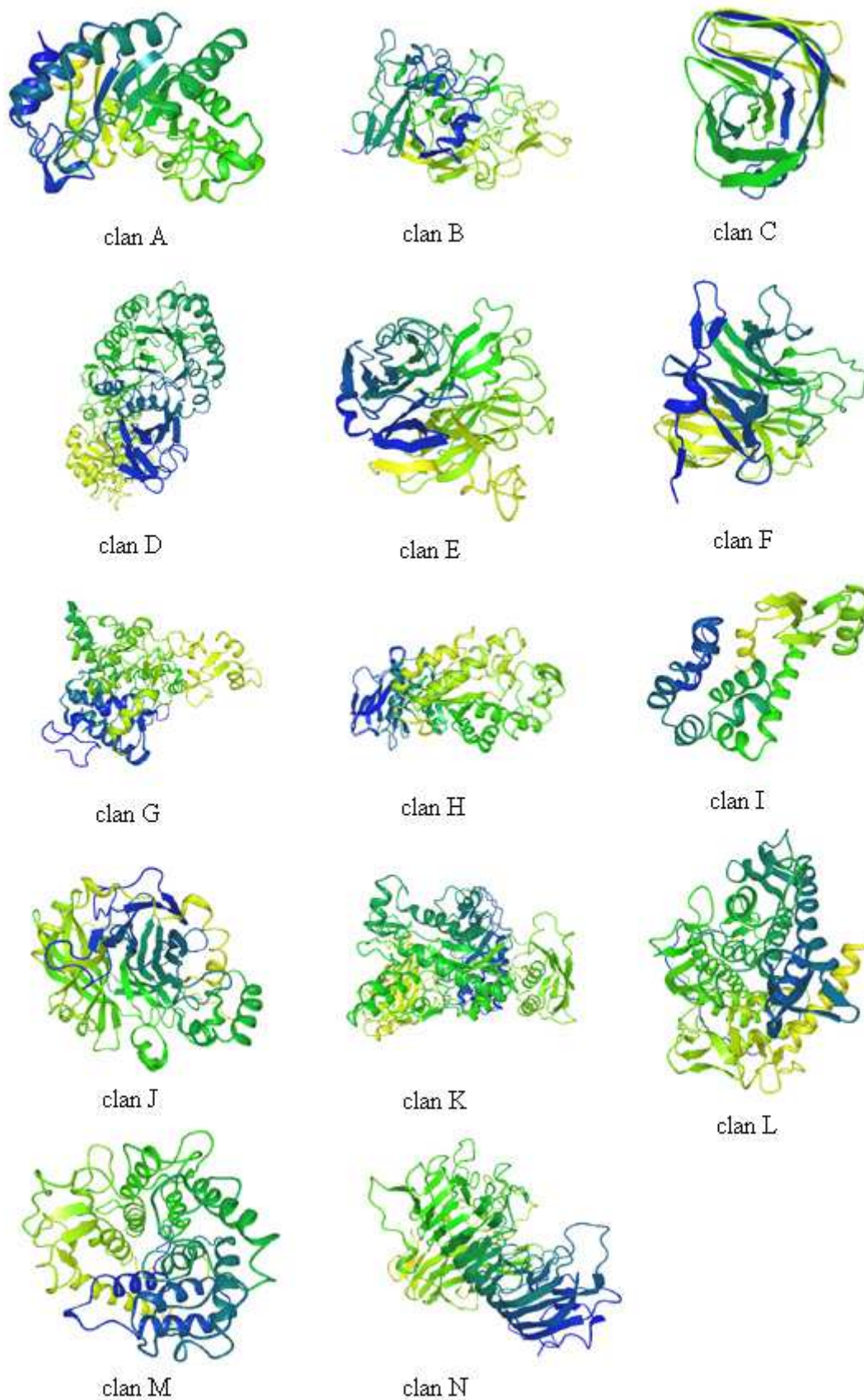


Figura I.5. Estructures tridimensionals d'un representant de cadascun dels 14 clans en què estan agrupades les diferents glicosidases descrites, segons la classificació de Henrissat.

I.3. Mètodes tradicionals per a l'estudi de mecanismes enzimàtics

Per tal d'anar perfilant i demostrant els diferents aspectes del mecanisme enzimàtic, s'han fet servir diferents experiments, que en gran mesura s'han basat en l'obtenció de dades cinètiques d'hidròlisi de substrats. Les cinètiques en estat preestacionari, les anàlisis de Hammett i la valoració dels efectes isotòpics en la velocitat de reacció, han estat les tres eines tradicionalment més emprades. Donat que els substrats naturals de les glicosidases són oligo i polisacàrids que no permeten un seguiment senzill de la cinètica de reacció, generalment es treballa amb substrats sintètics en què s'introdueix com a aglicona un cromòfor. L'avantatge d'aquests substrats enfront dels substrats naturals és que en cada cicle catalític es produeix la hidròlisi d'un únic enllaç per molècula de substrat, que dona lloc a un augment d'absorbància fàcilment caracteritzable. S'ha postulat que aquests substrats s'uneixen a l'enzim de manera anàloga als substrats naturals, i que l'aglicona s'uneix establint interaccions d'apilament hidrofòbic amb l'enzim, com ho faria una unitat sacarídica [17]. Des dels inicis de la seva utilització amb el lisozim [18], i la β -galactosidasa d'*Escherichia coli* [19], els aril glicòsids han demostrat ser molt útils en l'estudi mecanístic de glicosidases; a més, ofereixen la possibilitat de triar amb quin substrat es desitja treballar en funció de l'etapa del mecanisme a estudiar, ja que es pot escollir entre diferents aglicones amb un gran ventall de reactivitats.

La utilització d'aquests substrats cromofòrics en les cinètiques en estat preestacionari amb glicosidases que actuen amb retenció de configuració, ha permès la detecció de l'etapa determinant de la velocitat de reacció, i fins i tot en algun cas, la determinació del valor de la constant de velocitat individual de les diferents etapes. En aquest tipus d'experiment s'han desenvolupat diferents mètodes que aconsegueixen una barreja molt ràpida d'enzim i substrat, de manera que es pot seguir la cinètica de reacció des dels primers mil·lisegons. D'aquesta manera, i sempre que no s'assoleixi l'estat estacionari abans del temps mort de mesura, s'observa l'establiment del primer cicle de reacció. Si l'etapa lenta del mecanisme resulta ser l'etapa de glicosidació, s'observa una cinètica lineal, ja que no hi ha acumulació de l'intermedi de reacció. Si, per contra, l'etapa lenta és la desglicosidació, s'observa com es va acumulant l'intermedi de reacció fins assolir la velocitat d'estat estacionari. A més, si la velocitat de l'etapa de desglicosidació és suficientment lenta en comparació amb la velocitat de l'etapa de glicosidació, la fase d'acumulació de producte generat té una amplitud igual a la concentració de centres actius de l'enzim.

L'altre tipus d'experiment que permet distingir l'etapa limitant de la velocitat de reacció en les glicosidases que actuen amb retenció de configuració és l'anàlisi de Hammett, que és una relació lineal d'energia lliure. Al 1953 Hammett va postular una equació per tal de quantificar els canvis de reactivitat d'una família de compostos en relació amb la seva estructura [20]. L'aplicació d'aquesta equació en el cas de les glicosidases generalment té l'objectiu d'analitzar les variacions en la velocitat de reacció en funció de canvis en l'estructura d'una família de substrats. Amb aquest propòsit se solen fer servir una sèrie de substrats amb la mateixa part glicònica, que ve marcada per l'especificitat enzimàtica, i diferent aglicona cromofòrica. Fent una ullada al mecanisme (figura I.2) resulta senzill veure que la primera etapa, la de glicosidació, és dependent de la naturalesa de l'aglicona, però la segona etapa, o desglicosidació, n'és totalment independent, ja que parteix de l'intermedi glicosil-enzim, que és comú en tota la sèrie de substrats. Per tant, generalment se sol assumir que la desglicosidació, o una altra etapa

no-química (un canvi conformacional, o la unió o dissociació d'un lligand), és l'etapa determinant de la velocitat de reacció quan no s'observa un canvi en la velocitat de reacció en variar l'estructura del substrat; en el cas de donar-se una relació lineal entre aquests dos paràmetres, es postula que la glicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció. Si aquest és el cas, el pendent d'aquesta relació informa sobre el grau de desenvolupament de càrrega a l'estat de transició.

Finalment, a través de la determinació dels efectes isotòpics secundaris, generalment d' α -deuteri, en la velocitat de les diferents etapes de reacció s'obté informació sobre l'estructura de l'estat de transició, i de retruc de l'intermedi de reacció. L'efecte isotòpic secundari es genera com a conseqüència de la hidròlisi d'un enllaç adjacent a l'àtom que s'ha substituït pel seu isòtop. Es considera que aquests efectes tenen el seu origen en gran mesura per l'afebliment de la vibració de tensió de l'enllaç C-H a mesura que el centre de reacció passa d'hibridació sp^3 a sp^2 . La diferència de massa atòmica entre l'àtom d'hidrogen i els seus isòtops (habitualment el deuteri, D) es tradueix en una diferència en la velocitat relativa de reacció, de manera que quan es produeix un canvi d'hibridació de sp^3 a sp^2 , la relació de constants de velocitat k_H/k_D és entre un 10 i un 20% superior a la unitat [21]; si el canvi d'hibridació va en el sentit $sp^2 \rightarrow sp^3$ l'efecte isotòpic és invers; mentre que quan no es produeix canvi d'hibridació, la relació de velocitats és propera a la unitat [22]. En aplicar aquests estudis a les reaccions enzimàtiques cal tenir present que normalment la velocitat de reacció no ve limitada totalment per una etapa de reacció en concret, sinó que és una combinació de totes elles, de manera que, per tal d'estudiar una etapa en concret cal fer-la limitant, ja sigui triant el substrat adequat, modificant el pH o mutant l'enzim.

I.4. Estructura de l'intermedi de reacció i els estats de transició en la hidròlisi de glicòsids

El caràcter oxocarbocatiònic de l'estat de transició de la hidròlisi enzimàtica de glicòsids s'ha establert en base a dos tipus d'experiment diferents. D'una banda es comprova que, a l'igual que passa amb la hidròlisi espontània de glicòsids [23, 24], s'obtenen valors d'efectes isotòpics cinètics d' α -deuteri molt elevats en el cas de la hidròlisi de glicòsids per part de diferents glicosidases [19, 24-26], que són consistents amb un estat de transició amb un marcat caràcter oxocarbocatiònic. D'altra banda, i aprofitant que en la hidròlisi espontània de glicòsids el caràcter oxocarbocatiònic de l'estat de transició està molt ben establert [27-29], en el cas de la β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* [30] i la β -galactosidasa (*lacZ*) d'*Escherichia coli* [31], s'ha arribat a la mateixa conclusió, a través d'una correlació entre el log (k_{cat}) de la reacció enzimàtica i el log ($k_{espontània}$) per a la reacció no catalitzada, per a una sèrie de substrats. Una bona correlació entre aquests dos paràmetres permet assimilar l'estructura de l'estat de transició de la reacció catalitzada al de la reacció espontània. A l'hora d'avaluar aquest tipus d'experiments s'ha de tenir present que en la reacció enzimàtica poden donar-se una sèrie d'interaccions enzim-substrat que no es donen en la hidròlisi espontània, i que poden emascarar el resultat, provocant un empitjorament de la correlació.

En l'ió oxocarbocatiònic, la cessió electrònica per part de l'oxigen endocíclic a través de l'enllaç O5-C1 proporciona gran part de l'estabilització, i comporta que aquest enllaç posseeixi un cert caràcter de doble enllaç. Per tal que això es doni a l'estat de transició

els àtoms C5, O5, C1 i C2 han de ser coplanars, o estar a prop de la coplanaritat [8], de manera que l'anell de piranosa ha d'adoptar una de les quatre possibles conformacions que ho fan possible [32]: dues d'elles són mitges cadires, 4H_3 i 3H_4 , i dues són naus, ${}^{2,5}B$ i $B_{2,5}$ (figura I.6).

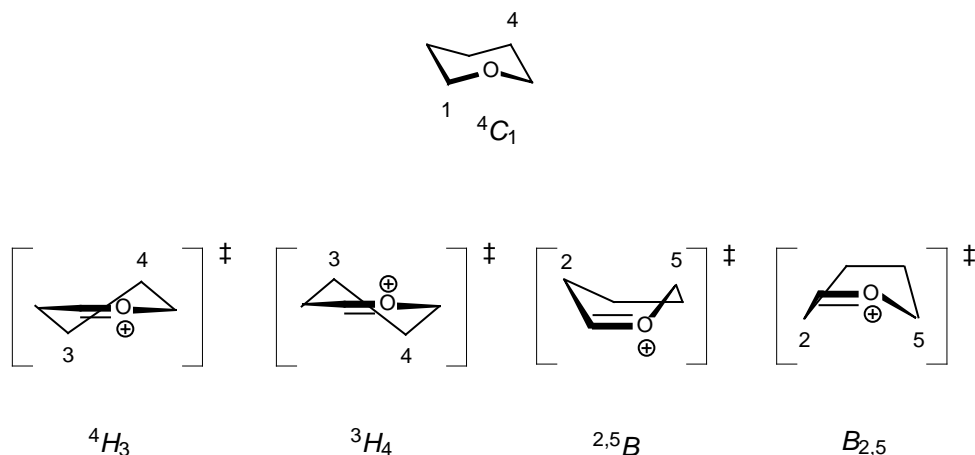


Figura I.6. A dalt: conformació de cadira relaxada, que és la conformació més estable adoptada per un anell de piranosa en solució. A baix: les quatre possibles conformacions que pot adoptar un anell de piranosa a l'estat de transició, i que garanteixen la coplanaritat dels àtoms C5, O5, C1 i C2.

La distorsió de l'anell de piranosa que ocupa el subseti -1 de la conformació de cadira relaxada, 4C_1 (que és la que presenta el glicòsid en solució) cap a alguna d'aquestes conformacions ajuda a satisfer els requeriments de la teoria estereoelectrònica, ja que orienta el parell d'electrons lliure de l'oxigen endocíclic antiperiplanar respecte de l'enllaç a escindir i del grup sortint; de manera que a més de maximitzar la donació electrònica de l'oxigen endocíclic a l'orbital antienllaçant del centre anomèric, acomodant molta de la càrrega positiva que es desenvolupa al centre anomèric durant els estats de transició, accelera l'expulsió del grup sortint [33, 34]. En conjunt s'ha proposat que hi ha cinc factors principals que conformen les característiques de l'estat de transició de les reaccions d'hidròlisi de glicòsids [35]. Aquestes són la distribució de càrrega positiva, un centre anomèric trigonal, una conformació de mitja cadira o similar (nau), una disposició adequada dels grups hidroxil, i la capacitat de l'oxigen interglicosídic de ser protonat direccionalment.

La naturalesa química de l'intermedi de reacció en les glicosidases que actuen amb retenció de configuració va ser durant molts anys motiu de controvèrsia. Tot i que en un principi es va proposar que l'intermedi glicosil-enzim es tractava d'un intermedi catiònic estabilitzat per interacció electrostàtica amb el nucleòfil, basant-se en la interpretació dels resultats obtinguts amb el lizozim de clara d'ou [24], actualment se sap que no és així. La confirmació que l'intermedi glicosil-enzim és covalent procedeix de dos tipus d'experiments diferents, d'una banda d'experiments d'efectes isotòpics secundaris d' α -deuteri mesurats sobre la cinètica de reacció per a substrats en què la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció [19, 36-39], i de l'altra per l'evidència directa de l'atrapament d'aquests intermedis de reacció en diverses glicosidases [40-44]. La metodologia més emprada per tal d'atrapar l'intermedi ha estat l'ús dels 2-desoxi-2-fluoroderivats proposada per Withers [45], en què substituïnt

l'hidroxil a C2 del sucre que ocupa el subseti -1 per un àtom de fluor s'aconsegueix alentir tant la glicosidació com la desglicosidació per la combinació de dos efectes: d'una banda, la desestabilització inductiva dels estats de transició oxocarbocatiònics, en ser el fluorur un acceptor de càrrega inductiu, i de l'altra, la pèrdua del pont d'hidrogen de l'hidroxil a C2 amb la proteïna, que en el cas de β -glicosidases que actuen amb retenció de configuració es postula que és molt important. Aquests compostos tenen a més un bon grup sortint com a aglicona, de manera que l'etapa de glicosidació passa a ser més ràpida que la de desglicosidació i això porta a l'acumulació de l'intermedi de reacció (figura I.7). D'altra banda, els efectes isotòpics mesurats per a l'etapa de desglicosidació de diferents glicosidases han estat invariablement més grans que 1, en un rang que van des de 1.25 per a la β -galactosidasa d'*Escherichia coli* [46], fins 1.11 per a una β -glucosidasa d'*Agrobacterium* sp. [37] i per a la Cex de *Cellulomonas fimi* [38], cosa que dóna suport a un intermedi covalent sp^3 flanquejat per estats de transició amb hibridació sp^2 .

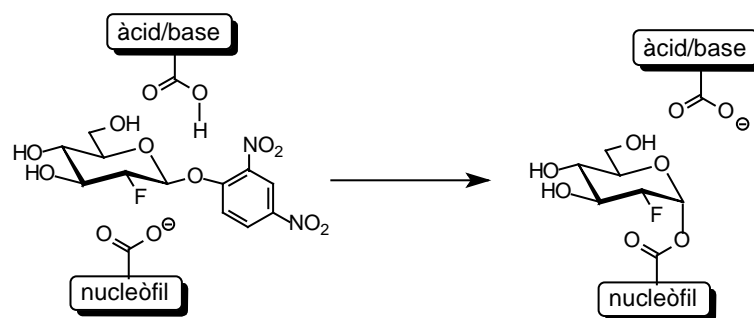


Figura I.7. Utilització de 2-desoxi-2-fluoroglicòsids activats amb la finalitat d'atrapar l'intermedi covalent glicosil-enzim en β -glicosidases.

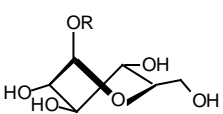
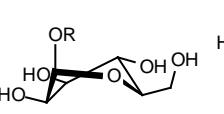
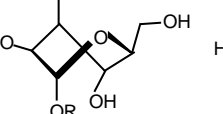
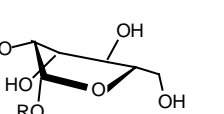
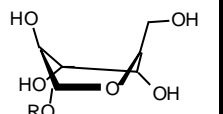
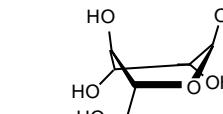
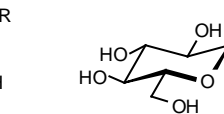
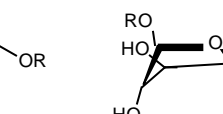
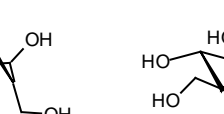
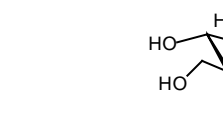
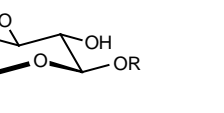
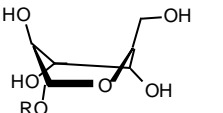
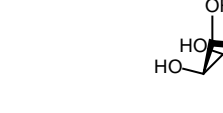
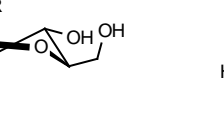
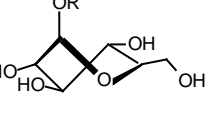
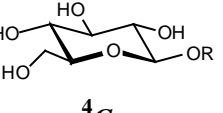
I.5. Estudi del mecanisme de glicosidases a través de les estructures cristal·logràfiques de diferents complexos enzim·ligand

En la darrera dècada i mitja, el gran avenç en la resolució d'estructures cristal·logràfiques de complexos glicosidasa·ligand ha permès anar un pas més enllà, i fent servir inhibidors específics, tècniques de congelació ràpida, o amb la utilització de mutagènesi dirigida, s'ha pogut obtenir l'estructura d'un bon nombre d'estructures representatives del complex de Michaelis (complex enzim·substrat productiu), de l'intermedi covalent glicosil-enzim, del complex amb el producte de reacció i de complexos amb inhibidors anàlegs a l'estat de transició. A través d'aquests complexos s'ha plantejat el desenvolupament de la reacció a nivell estructural, proposant alhora una conformació per a l'estat de transició, per a diferents glicosidases.

El que s'ha comprovat com un tret comú a les glicosidases estudiades fins al moment, és el fet que durant la catàlisi l'estructura tridimensional de l'enzim no experimenta canvis conformacionals importants. Amb tot, s'han observat dos tipus de moviment induïts per la unió del substrat, d'una banda reestructuracions en parts mòbils de la proteïna [47], com llaços externs [48-56], o moviments relatius de diferents mòduls de la proteïna [57, 58], i d'altra, la reorientació dels residus del centre actiu implicats en catàlisi o en la unió del substrat [59-61]. De forma totalment diferent, la conformació del sucre experimenta una sèrie de canvis per tal d'adaptar-se a les diferents etapes de la

reacció [62-64]. Els canvis principals en la conformació del glicòsid es donen a la unitat que ocupa el subseti -1, que és la unitat que sustenta l'enllaç glicosídic que s'hidrolitza durant la reacció. Generalment les unitats de piranosa que s'uneixen en els altres subsetis totes presenten la conformació de cadira relaxada 4C_1 , mentre que la piranosa del subseti -1 va experimentant diferents conformacions al llarg del cycle catalític.

Taula I.1. Conformacions observades en les estructures cristal·logràfiques dels complexos de Michaelis, de l'intermedi covalent i en el complex amb el producte de reacció en diferents glicosidases. Per tal de representar les diferents conformacions s'ha fet servir un anell de glucopiranosid com a referència, tret de la conformació 1S_5 que només s'ha observat en mannòsids.

Conformacions observades en el complex de Michaelis				
				
1S_3	1S_5	3S_1	2S_0	${}^{2,5}B$
[65-73]	[74]	[75]	[54, 60, 76-79]	[11, 80]
				
${}^{1,4}B$	1C_4	$B_{2,5}$	4C_1	
[68, 81]	[82, 83]	[84]	[51, 54, 78, 85-96]	
Conformacions observades en l'intermedi covalent				
				
4C_1	${}^{2,5}B$	0S_2		
[39, 51, 66, 70, 84-87, 92, 97-114]	[115-118]	[74]		
				
1S_5	1S_3	3S_1		
[119]	[120]	[121]		
Conformacions observades en el complex amb el producte de reacció				
				
	4C_1			
	[60, 66, 69, 72, 85, 86, 90, 92, 94, 95, 102, 106, 110, 118, 122-139]			

El nombre de conformacions observades per als diferents complexos és reduït (taula I.1), i permeten definir un patró de comportament. D'entrada, sembla que en el complex de Michaelis el glicòsid que ocupa el subseti -1 presenta generalment una conformació distorsionada d'alta energia. Per tal de compensar el cost energètic que suposa la distorsió en alguns casos es proposa que l'energia necessària ve donada per una sèrie d'interaccions no covalents addicionals a través de ponts d'hidrogen que s'estableixen en l'estat de transició distorsionat [30, 140, 141]. I en d'altres casos, en què l'enzim presenta un centre actiu estès, es proposa que són les de xarxes de ponts d'hidrogen i interaccions d'apilament hidrofòbic favorables en els altres subsetis, les que forcen la distorsió del substrat en el subseti -1 [35, 54, 65, 142-144]. En qualsevol cas, la distorsió del substrat cap a una conformació tensionada sembla un tret tan generalitzat, que inclús en els casos en què no s'observa es proposa que possiblement s'hagi cristal·litzat una forma d'unió del substrat no productiva [51, 89, 93, 94], o que la mutació introduïda és la responsable que no s'observi distorsió [78, 86, 96]. De forma contrària, en el complex amb el producte de reacció, en què les interaccions enzim-glicòsid són més aviat escasses, fins al punt que de vegades no es pot ni arribar a determinar la conformació del glicòsid per trobar-se en forma desordenada [51, 66, 80, 106, 128], bàsicament s'observa la conformació de cadira relaxada 4C_1 , tret del cas de dues fucosidases en què es comprova que la conformació és 1C_4 [82, 121], que és la conformació de cadira relaxada per a la L-fucosa. La conformació adoptada en el complex que descriu l'intermedi de reacció és més variable, i s'han observat tant estructures amb conformació relaxada com estructures que responen a conformacions més tensionades.

Al 1971 Stoddart va definir un mapa amb les diferents conformacions que pot adoptar un anell de glucopiranosà, centrat en la conformació de cadira relaxada (que és l'adoptada en solució), i va relacionar-les a través d'interaccions directes en el que s'ha anomenat el diagrama de Stoddart [145]. Basant-se en aquest diagrama i en les estructures dels diferents complexos enzim-lligand obtingudes s'han proposat, fins al moment, quatre itineraris conformacionals que seguirien diferents grups de glicosidases en funció del substrat sobre el que actuen (figura I.8) [32, 66, 68, 70, 74, 77, 104, 115, 119, 146-148]. Aquestes propostes s'han realitzat sota la premissa de definir el camí més curt entre dues conformacions que compregui una de les quatre conformacions possibles que pot adoptar l'estat de transició. A la figura I.8 es mostra una visió parcial del diagrama de Stoddart, en el que s'han enquadrat els quatre camins conformacionals proposats fins al moment per a diferents glicosidases, i on a les quatre conformacions que es proposa que pot adoptar l'estat de transició oxocarbocatiònic es mostra ombrejat el pla definit pels àtoms C5, O5, C1 i C2.

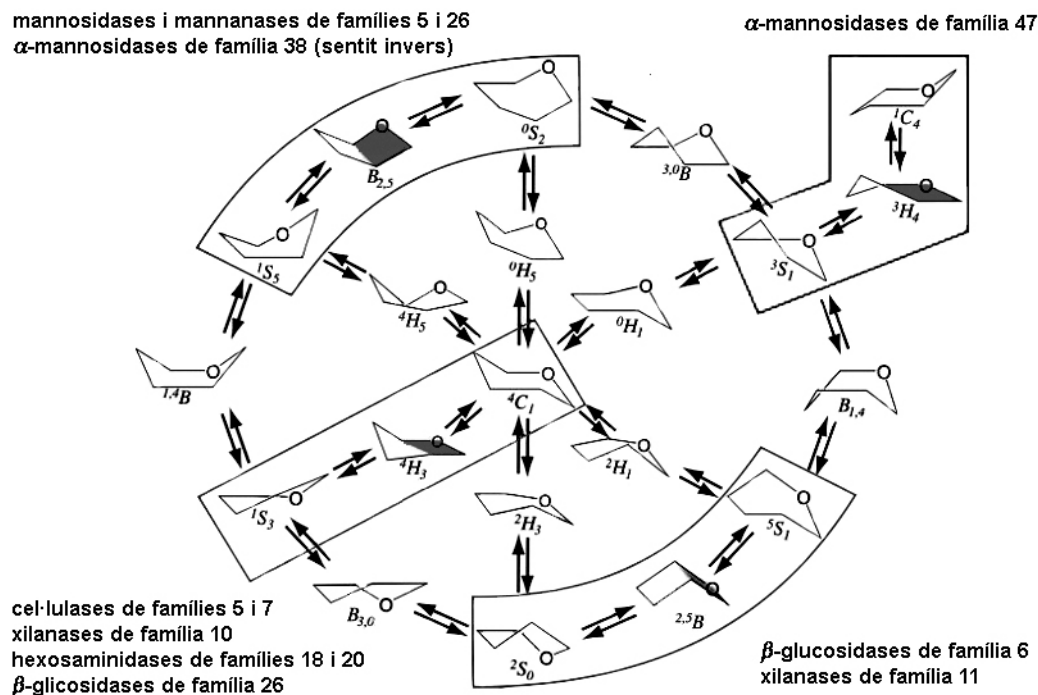


Figura I.8. Mapa parcial de les interconversions entre diferents itineraris conformacionals de piranoses, en què es mostren remarcades les diferents coordenades de reacció proposades en el cas de diferents glicosidases. A les quatre conformacions que pot adoptar l'estat de transició oxocarbocàtionic està ombrat el pla definit pels àtoms C5, O5, C1 i C2.

Sembla que aquests itineraris conformacionals sorgeixen com un compendi entre els requeriments estèrics i estereoelectrònics imposats pel glicòsid, i els requeriments geomètrics imposats pel centre actiu de l'enzim. De manera que ni tots els enzims d'una mateixa família fan servir el mateix itinerari, ni tots els enzims que actuen sobre una mateixa família de substrats segueixen el mateix camí. Només segueixen itineraris conformacionals iguals les glicosidases que estant relacionades estructuralment, actuen sobre substrats similars [32]. Així doncs, es comprova com a través de l'estructura tridimensional de diferents complexos amb glicosidases es pot anar definint el camí seguit pel sucre durant un cicle catalític, completant d'aquesta manera la informació mecànica aportada per les altres tècniques basades en les cinètiques de reacció.

I.6. 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*

La present tesi es basa en l'estudi del mecanisme enzimàtic de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Amb aquesta finalitat s'han aplicat metodologies com la determinació de cinètiques en estat preestacionari, la realització d'anàlisis de Hammett, i la determinació de la importància de la interacció amb l'hidroxil a C2 sobre l'activitat hidrolítica de l'enzim salvatge i alguns mutants del centre actiu. Malgrat que en el cas de les 1,3-1,4-β-glucanases de *Bacillus*, apart de les estructures cristal·logràfiques de diferents enzims lliures, fins al moment només es disposa de l'estructura cristal·logràfica d'un complex enzim-producte [149], per a la reacció de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* s'ha proposat un camí conformacional que procediria a través d'un estat de transició de mitja cadira 4H_3 , basant-se en els resultats

obtinguts a través d'experiments de dinàmica molecular d'un complex enzim-substrat [150].

I.6.1. Especificitat per substrat i estructura tridimensional de les 1,3-1,4- β -glucanases

Les 1,3-1,4- β -glucanases són endopolisacaridases amb una marcada especificitat per la hidròlisi d'enllaços β -1,4 en unitats de glucopiranososa 3-*O*-substituídes [151-154]. Els substrats naturals d'aquests enzims són els 1,3-1,4- β -glucans, que són polisacàrids components de la paret cel·lular d'algunes plantes superiors, i especialment abundants a les parets cel·lulars de l'endosperma de cereals com l'ordi, l'arròs i el blat [155], i el liquenà de molsa d'Islàndia. Es tracta de polímers de glucosa bàsicament lineals amb enllaços mixtos β -1,3 i β -1,4, amb proporcions variables d'aquests dos tipus d'enllaç, i una abundància relativa d'enllaços β -1,3 entre el 25 i el 30%. El 90% de l'estructura dels 1,3-1,4- β -glucans solubles està composta per unitats de cel·lotriosa i cel·lotetraosa unides per enllaços β -1,3 [151, 153, 155], i d'aquí que els productes majoritaris de la hidròlisi d'aquests substrats siguin el trisacàrid 3-*O*- β -cel·lobiosil-D-glucopiranososa (G4G3G) i el tetrasacàrid 3-*O*- β -cel·lotriosil-D-glucopiranososa (G4G4G3G) [156, 157] (figura I.9). Donat que cada cop es comprova amb més exemples que la conformació adoptada pels substrats polisacàrids en solució i dins del centre actiu generalment és la mateixa (independentment de la distorsió de substrat que es dóna en el subseti -1) [158, 159], s'ha plantejat en diversos casos que és la complementaritat de forma entre el centre actiu i el substrat la que dicta l'especificitat per substrat dels enzims [123, 159-162].

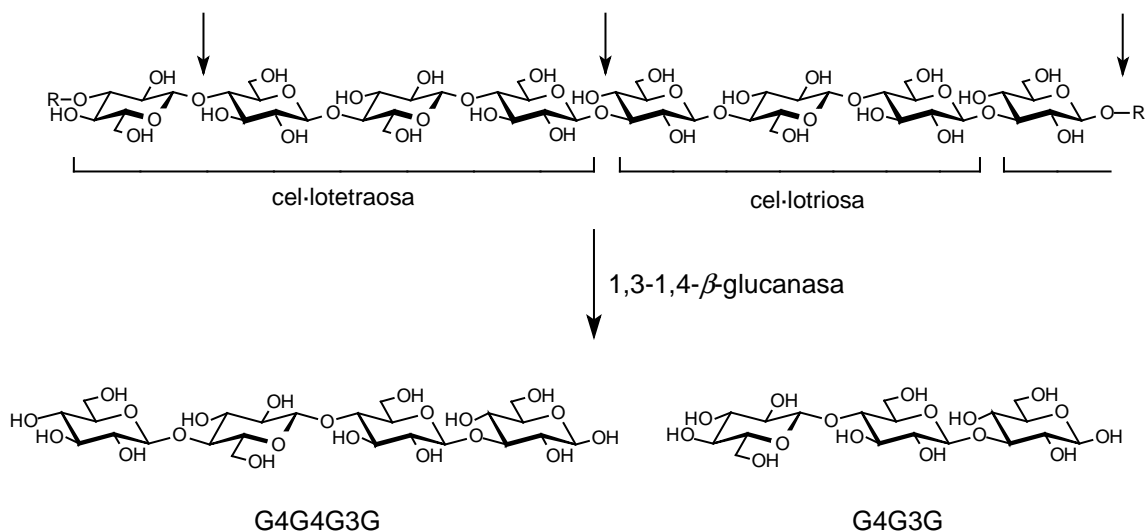


Figura I.9. Productes majoritaris obtinguts emprant la 1,3-1,4- β -glucanasa, en la hidròlisi del seu substrat natural. Sobre l'estructura del polímer s'indiquen els possibles punts d'hydròlisi.

Les 1,3-1,4- β -glucanases són una de les famílies d'enzims encarregades de la despolimerització d'aquests β -glucans, i s'ha observat la seva expressió en plantes superiors [163, 164], així com a diferents espècies de bacteris (*Bacillus* [165-174], *Fibrobacter succinogenes* [175], *Ruminococcus flavefaciens* [176], *Clostridium*

thermocellum [177, 178], *Rhodothermus marinus* [179]), fongs [180, 181] i virus [182]. Els enzims microbians i els vegetals són molt diferents tant a nivell de seqüència primària com a nivell d'estructura terciària [183, 184], i tot i presentar la mateixa especificitat per substrat, els seus centres actius tenen estructures clarament diferenciades [185] (figura I.10). Per aquest motiu, estan classificats en dues famílies diferents de glicosil hidrolases, de manera que les β -glucanases expressades per plantes superiors estan incloses a la família 17, mentre que les microbianes formen part de la família 16.

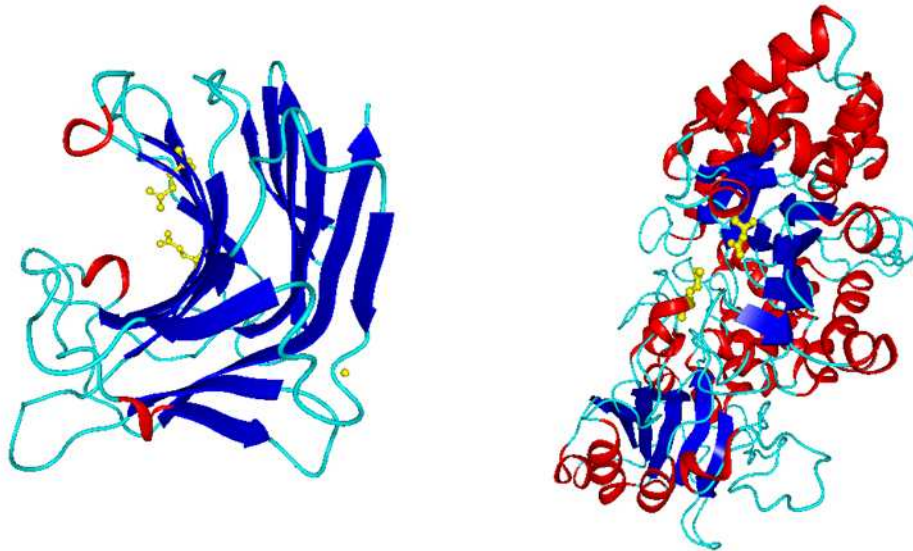


Figura I.10. Estructura tridimensional de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (esquerra) i la 1,3-1,4- β -glucanasa d'ordi (dreta). S'indiquen els dos residus catalítics i l'àtom de Ca^{2+} en groc.

S'han resolt diverses estructures tridimensionals de 1,3-1,4- β -glucanases microbianes, la de *Bacillus licheniformis* [10], la de *Bacillus macerans* [186], la d'un híbrid, el H(A16-M), que conté els 16 primers aminoàcids de la β -glucanasa madura de *Bacillus amyloliquefaciens* i els residus del 17 al 214 de la proteïna de *Bacillus macerans* [183, 187], les d'una sèrie de glucanases basades en la proteïna híbrida i en la de *Bacillus macerans* que s'havien permutat circularment [157], i la de *Fibrobacter succinogenes* [188]. El nucli de la proteïna està format per dues fulles β , formades per 7 cadenes antiparal·lels cadascuna, que es corben una sobre l'altra donant lloc a l'escaleta que travessa l'enzim d'una banda a una altra, i que conforma el centre actiu. El llaç més important, que està unit al nucli de la proteïna a través d'un pont disulfur, se situa cobrint parcialment el centre actiu. A la part convexa de la molècula, s'uneix un àtom de Ca^{2+} que estabilitza l'estructura de la proteïna [189, 190]. El fet que en totes les β -glucanases de *Bacillus* i inclús a la de *Fibrobacter succinogenes*, amb només un 30% de similitud de seqüència, s'hagi vist el mateix plegament, indica que aquest és força rígid. Per contra, l'estructura tridimensional de la β -glucanasa d'ordi, que pertany a la família 17, presenta una estructura de barril α/β [185, 191], que no té res a veure amb l'anterior (figura I.10).

I.6.2. Caracterització de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Des de l'any 1993 la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* ha estat un dels enzims objecte d'estudi al Laboratori de Bioquímica de l'Institut Químic de Sarrià. A la taula I.2 es mostren cronològicament els diferents avenços realitzats en l'estudi del mateix des dels seus inicis, i a continuació es resumeixen els resultats amb transcendència per a la present tesi doctoral.

Taula I.2. Resum dels resultats més rellevants obtinguts en la caracterització de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus*.

Any	Tema	Resultats principals	Ref.
1992	Expressió en <i>Escherichia coli</i> i purificació	Puresa >95%, enzim secretat	[192]
	Residus catalítics: mutagènesi dirigida (per similitud de seqüència amb lisozims)	Glu134 és un residu essencial en catàlisi	[193]
	Estructura secundària per dicroïsmes circulars	Formada majoritàriament per fulles β	[194]
1993	Tipus de mecanisme i especificitat d'hidròlisi	Retenció de configuració, estricta i específica	[156]
1994	Metodologia de PCR per a mutagènesi dirigida	Optimització del mètode amb 3 encebadors	[195]
	Residus catalítics: mutagènesi d'escombratge (per similitud de seqüència amb β -glucanases de <i>Bacillus</i>)	Glu134 i Glu138 són residus essencials	[196]
	Conformació en solució dels productes d'hidròlisi	Descripció d'angles interglicosídics de G4G3G i G4G4G3G	[197]
1995	Substrats sintètics: 4'-metilumbel·liferil glicòsids	Síntesi de (G4) _n G3G-MU; n = 0-3	[198]
	Contribució a catàlisi i estabilitat del pont disulfur	L'enllaç S-S contribueix poc a l'estabilitat i no afecta l'activitat	[199]
	Estudis d'inhibició amb β -glucan- i cel·lulooligosacàrids	Contribució en catàlisi dels diferents subconjunts	[16]
	Estructura 3D per cristal·lografia de raigs X	Estructura <i>jellyroll</i> β sandwich	[10]
1996	Ús de la 1,3-1,4- β -glucanasa en la síntesi de substrats 4'-metilumbel·liferil	Millora de la síntesi de G4G3G-MU, i determinació de paràmetres cinètics d'hidròlisi enzimàtica	[200]
	Síntesi quimioenzimàtica de tio-oligosacàrids	Els tiooligosacàrids són inhibidors competitiu	[201]
1997	Anàlisi mutacional del llaç principal: mutagènesi d'escombratge per alanina	Correlació d'estabilitat i activitat dels mutants en residus del llaç	[202]
	Activitat transglicosidasa per control cinètic	Síntesi de 1,3-1,4- β -oligosacàrids (rendiment 5-40%)	[203-205]
	Mecanisme: mapatge de subconjunts, perfil de pH, modificació química	Contribució a l'estabilització de l'estat de transició dels subconjunts -1 a -4 i pK _a dels residus catalítics	[206]
1998	Residus catalítics: anàlisi per rescat químic	Glu134 és el nucleòfil, Glu138 és l'àcid-base general	[207]
	Mecanisme: anàlisi de Hammett de l'enzim salvatge	Gràfics de Hammett: log k _{cat} vs pK _a convex descendent i log k _{cat} /K _M vs pK _a lineal ($\beta = -0.7$)	[208]
	Termostabilitat de l'enzim: anàlisi computacional i mutacional	El mutant N57A és termoresistent	[209]
	Redisseny de glicosidasa a sintasa	El mutant E134A és una glicosintasa	[210, 211]

1999	Complex proteïna-substrat: anàlisi mutacional de residus implicats en unió	Interaccions per pont d'hidrogen i apilament hidrofòbic entre residus dels subsetis -1 a -4 i el substrat	[212]
	Mecanisme: mapatge de subsetis per l'extrem reductor	Contribució a l'estabilització de l'estat de transició dels subsetis +1 i +2	[213]
2001	Mecanisme: intermedi glicosil-enzim	Detecció de l'intermedi α -glicosil format	[214]
	Mecanisme: estudis cinètics en estat preestacionari del mutant E134A	Proposta del mecanisme d'unió enzim-substrat	[215]
	Aplicació glicosintasa: reacció <i>one-pot</i>	Síntesi per combinació de dues glicosintases de G4G4G3G4G4GOMe i Gal4G4G3G4G4GOMe	[216]
2002	Glicosintasa: especificitat pel subseti -3	Gal4G3G- α F és donador de la reacció glicosintasa	[217]
2003	Mecanisme glicosintasa: residu catalític, perfil de pH, modificació química. Anàlisi cinètica de les reaccions en competència de la reacció glicosintasa	El Glu138 és la base general de la reacció glicosintasa amb un pK_a de 5.3	[218]
	Mecanisme: Avaluació de la interacció de l'enzim amb l'hidroxil a C2 de la glucopiranososa que ocupa el subseti -1	La tirosina 152 no interacciona directament amb l'hidroxil a C2, però ajuda a posicionar el nucleòfil, que si que hi interacciona	[219]
	Mecanisme: estudis cinètics en estat preestacionari de l'enzim salvatge	Proposta del mecanisme catalític	[220]
2004	Aplicació glicosintasa: polisacàrids	Síntesis quantitatives de 1,3-1,4- β -glucans	[221]
2006	Estructura cristal·logràfica del complex β -glucanasa-hexasacàrid G4G4G3G4G4GOMe	Interaccions del complex enzim-producte	[149]
	Dinàmiques moleculars del complex enzim-substrat	Distorsió del substrat en el complex de Michaelis	[150]

El centre actiu de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* està format per quatre subsetis que uneixen l'extrem no-reductor del sucre i dos subsetis més que uneixen l'extrem reductor. S'ha arribat a aquesta conclusió tant a partir de cinètiques de reacció amb substrats amb diferent grau de polimerització [206, 213], com a partir dels modelatges moleculars d'un hexasacàrid a les estructures dels enzims salvatges de *Bacillus licheniformis* [222] i de *Bacillus macerans* [186]. La utilització de substrats amb diferent estereoquímica ha permès comprovar que l'especificitat per substrat de la β -glucanasa ve marcada per un requeriment estructural que imposa un enllaç β -1,3 entre els subsetis -1 i -2, i un enllaç β -1,4 entre els subsetis -2 i -3. La resta de subsetis són més flexibles i accepten tant enllaços β -1,3 com β -1,4. De fet, tant en les estructures dels modelatges moleculars com en l'estructura cristal·logràfica del complex amb el producte de reacció, obtingut en el cas de la β -glucanasa de *Bacillus macerans* [149], es comprova que la unió en els subsetis més allunyats del punt d'hidròlisi és bastant laxa. El centre actiu de la proteïna està format majoritàriament per residus aromàtics a les seves parets i residus àcids a la part inferior.

La 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* hidrolitza enllaços glicosídics a través d'un mecanisme amb retenció de configuració [156] (figura I.11). Té un punt isoelèctric bàsic i la seva temperatura òptima d'activitat enfront del seu substrat natural a pH 7.2 és de 55 °C [169]. El perfil d'activitat enfront del pH de l'enzim mostra una corba gaussiana per al paràmetre cinètic k_{cat}/K_M , amb dos pK_a cinètics de 5.5 i 7.0 assignables en l'enzim lliure, als residus que actuen com a nucleòfil i com a àcid/base general,

respectivament [206]. El pK_a del residu que actua com àcid/base general passa a ser de 7.3 en el complex enzim-substrat en unir el substrat sintètic 4'-metilumbel·liferil O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosid (G4G3G-MU) [206], i de 8.5 amb el substrat natural [196]. El mapatge del centre actiu per la banda que uneix l'extrem no reductor del substrat, així com la caracterització dels diferents mutants de l'enzim, s'ha realitzat amb substrats de la família (G4) $_n$ G3G-MU [198]. Els resultats que s'han obtingut permeten concloure que el subseti -3 és el que aporta una major estabilització de l'estructura de l'estat de transició. A la figura I.11 es mostra la reacció catalitzada per la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* sobre aquesta família de substrats, i a la taula I.3 es recullen els paràmetres cinètics obtinguts en la seva hidròlisi enzimàtica.

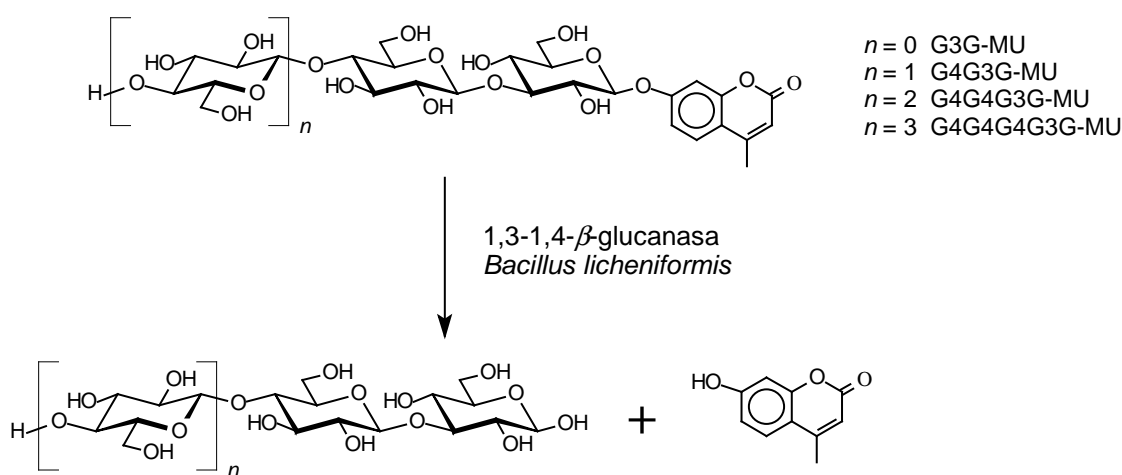


Figura I.11. Reacció catalitzada per la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* sobre els 4'-metilumbel·liferil glicòsids emprats en la caracterització cinètica de l'enzim.

Taula I.3. Paràmetres cinètics obtinguts en la hidròlisi d'una família de 4'-metilumbel·liferil glicòsids emprant la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a 30 °C i pH 7.2 [206].

Substrat	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	K_M / mM	K_I / mM	$(k_{\text{cat}}/K_M) / \text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$
G3G-MU	0.139 ± 0.012	16.8 ± 2.2	57 ± 12	8.27 ± 1.80
G4G3G-MU	4.58 ± 0.06	2.69 ± 0.06	37.8 ± 1.5	1700 ± 60
G4G4G3G-MU	8.86 ± 0.010	0.79 ± 0.02	36.4 ± 1.8	11200 ± 500
G4G4G4G3G-MU	8.78 ± 0.020	0.66 ± 0.03	29.3 ± 4.9	13300 ± 900

Per tal d'identificar els dos residus catalítics s'han fet servir diverses estratègies. La identificació del residu que actua com a nucleòfil es basa en dos tipus d'experiments diferents: d'una banda, es comprova que els mutants del residu glutamat 134 són inactius [193, 196]; i de l'altra, s'observa que a l'estructura cristal·logràfica d'un complex de l'híbrid H(A16-M) amb l'inhibidor 3',4'-epoxibutyl cel·lobiosid (figura I.12), s'observa modificat covalentment el residu equivalent (Glu105) [183]. Aquests resultats donen suport a la identificació del Glu134 de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* com a nucleòfil.

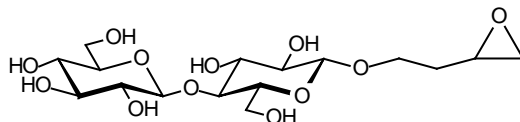


Figura I.12. Estructura de l'inhibidor 3',4'-epoxibutil cel·lobiosid.

La identificació del residu que fa el paper d'àcid general es va realitzar a través d'un estudi en què es van mutar tots els residus aspartat i glutamat conservats de la β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* als seus corresponents residus isostèrics no carregats, glutamina i asparagina [196]. Una avaluació de les cinètiques de reacció d'aquests mutants permet determinar que apart del mutant E134Q, l'únic que rendeix un mutant inactiu és el mutant E138Q, de manera que es va proposar que aquest és el residu que actua com a àcid/base general. Es va comprovar que hi ha un tercer residu que també és important per a l'activitat enzimàtica, l'Asp136, i es va proposar que el seu paper podria ser el de modular el pK_a dels residus catalítics. A l'estructura cristal·logràfica tant de l'enzim lliure com del complex amb l'inhibidor de la 1,3-1,4- β -glucosidasa híbrida es veu que aquests dos residus estan ben posicionats per tal d'exercir la seva activitat catalítica, i la distància entre els dos residus és l'esperada en una glicosidasa que actua amb retenció de configuració [183]. Més endavant, en el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* es va realitzar la comprovació inequívoca de la identitat dels dos residus catalítics a través d'experiments de rescat químic amb azida [207] i formiat [214].

Com la resta de glicosidases que actuen amb retenció de configuració la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* és capaç de formar enllaços glicosídics entre sucres donadors i acceptors. Si bé no s'ha observat la síntesi d'oligosacàrids de grau de polimerització superior emprant donadors del tipus *p*-nitrofenil β -glicòsids, sí que s'ha pogut detectar fent servir donadors del tipus fluorur de β -glicosil [203-205]. La reacció és regio- i estereoespecífica amb la formació d'un nou enllaç glicosídic β -1,4, de forma que la reacció de transglicosidació mostra la mateixa especificitat que la reacció hidrolítica (figura I.13). L'extensió de la reacció de transglicosidació en l'enzim salvatge depèn de la major velocitat d'atrapament de l'intermedi per part de l'acceptor glicosil que no pas per l'aigua.

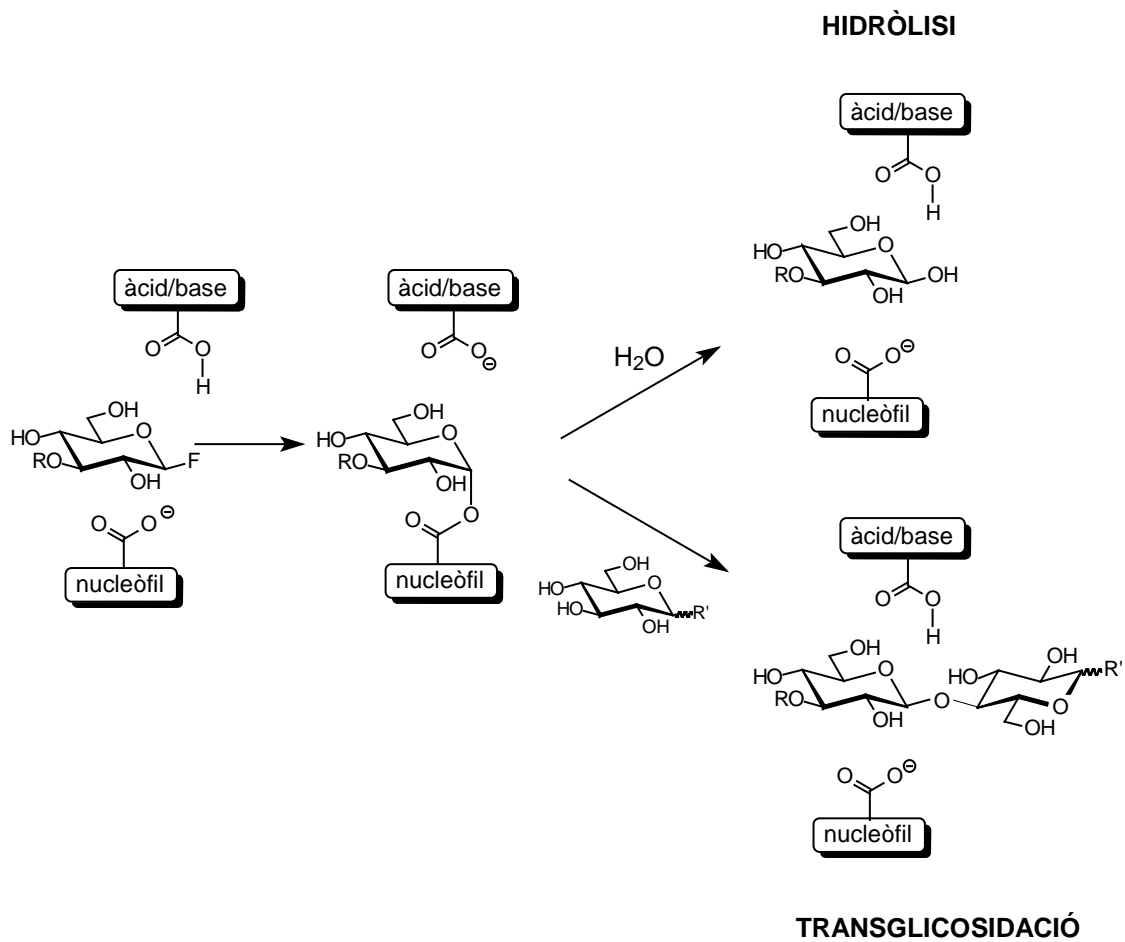


Figura I.13. Esquema on es mostren les dues activitats que presenta l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Apart de les reaccions d'hidròlisi i transglicosidació esmentades, la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* presenta una tercera activitat enfront de glicals que presentin la configuració adequada [223]. És a dir, és capaç d'hydratar glicals amb estructura G4G3G' en què l'estereoquímica dels enllaços entre unitats sacarídiques es correspon amb la marcada per l'estructura del centre actiu (G' indica una unitat de glucal (1,5-anhidro-2-desoxi-D-arabino-hex-1-enitol)) (Figura I. 14).

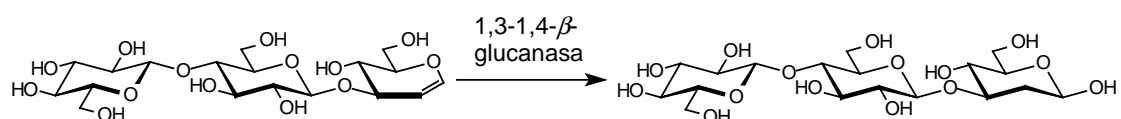


Figura I.14. Hidratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Tradicionalment, els glicals són inhibidors competitiu de les glicosidases, i s'ha plantejat que l'estructura planar de la unitat que introdueix el doble enllaç podria fer d'ells bons inhibidors anàlegs a l'estat de transició. Malgrat això, s'ha comprovat que en

la majoria dels casos en què es comporten com inhibidors no solen ser gaire bons, i en alguns casos, en comptes de ser inhibidors es comporten com a pseudosubstrats d'algunes glicosidases, que els hidraten a 2-desoxiglicòsids. La particularitat d'aquesta reacció, és l'estereoquímica de la reacció d'hidratació, ja que en algunes glicosidases sembla que els papers dels residus catalítics estan canviats. La 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* realitza una *trans*-hidratació del glical, que va portar a suggerir que el residu que actua com a nucleòfil en la reacció d'hidròlisi és el que exerceix la protonació inicial del doble enllaç [223].

Objectius

Com ja s'ha esmentat, l'objectiu principal de la present tesi és l'aprofundiment en el mecanisme catalític de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a través d'estudis clàssics de cinètiques enzimàtiques. Paral·lelament s'estudia l'efecte de determinats residus del centre actiu en la reacció per tal d'elucidar el seu paper en catàlisi. L'elecció dels residus a estudiar es basa en l'estructura del modelatge molecular de l'hexasacàrid G4G4G3G4G4G realitzat sobre l'estructura de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus macerans* [187], que pren com a referència el complex d'aquest enzim amb un inhibidor epoxibutil glicòsid [183]. El fet que la similitud de seqüències entre les β -glucanases de *Bacillus licheniformis* i *Bacillus macerans* sigui d'un 75.5%, i especialment elevada en el centre actiu, permet extrapolar les interaccions del centre actiu amb el substrat per a la β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a partir de les interaccions observades per a l'enzim de *Bacillus macerans*. En el modelatge inicial no es considera la distorsió de la conformació del substrat en el subseti -1, però s'observa una tensió notable (4 kcal·mol⁻¹) en la geometria de l'enllaç glicosídic que se situa entre els subsetis -1 i +1. A cada capítol s'estudia un aspecte diferent del mecanisme enzimàtic.

Els dos primers capítols es dediquen a explicar l'obtenció dels materials necessaris per a la realització dels estudis cinètics, tant a nivell d'enzim, com a nivell de substrats.

El tercer capítol es dedica a l'estudi de la cinètica de la reacció d'hidratació del glicol G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. S'avalua també el paper dels tres residus àcids situats entre els subsetis -1 i +1, el glutamat 134, l'aspartat 136 i el glutamat 138, en la reacció d'hidratació del glicol. Finalment, es realitza un perfil de pH complet de la reacció per tal de comprovar els canvis de pK_a associats, i s'extreuen les conclusions mecanístiques pertinents.

Al quart capítol s'estudia l'efecte de la interacció de la 1,3-1,4- β -glucanasa amb l'hidroxil a C2 de la unitat de glucopiranososa que ocupa el subseti -1. S'ha observat extensament que a les β -glicosidases que actuen amb retenció de configuració, aquesta és una interacció clau per a l'estabilització de l'estat de transició, que ja s'ha postulat com un tret característic i important en el mecanisme d'aquestes glicosidases. En el modelatge molecular inicial de la 1,3-1,4- β -glucanasa es va observar que aquest hidroxil només interacciona amb la tirosina 152, però donat que el residu que actua com a nucleòfil s'ha vist sempre implicat en la interacció amb l'hidroxil a C2 en glicosidases que actuen amb retenció de configuració, en el present treball s'ha decidit estudiar la interacció amb aquests dos residus. Donat que el mutant en el nucleòfil rendeix un enzim inactiu, aquesta interacció s'estudia des del punt de vista de l'enzim amb mutants en la posició de la tirosina 152, i des del punt de vista del glicòsid fent servir un anàleg del substrat en què s'ha substituït aquest grup hidroxil per un àtom d'hidrogen.

En el cinquè capítol s'estudien les cinètiques de la 1,3-1,4- β -glucanasa en estat preestacionari, per tal de determinar el que succeeix durant l'establiment del primer cicle catalític. D'una banda, s'estudien les cinètiques amb el mutant inactiu E134A per tal de descriure el procés d'unió enzim-ligand. De l'altra, s'avaluen les cinètiques de l'enzim salvatge amb diferents substrats per tal de discernir la influència de la part glicònica i aglicònica del substrat en el mecanisme de reacció.

En el sisè capítol es realitzen anàlisis de Hammett per tal d'ampliar el coneixement sobre el mecanisme catalític de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, amb l'objectiu de determinar quina és l'etapa determinant de la velocitat de reacció i el grau de desenvolupament de càrrega existent a l'estat de transició. Se sotmeten al mateix estudi dos mutants de la 1,3-1,4- β -glucanasa en què s'ha substituït el residu Trp221 situat al subseti +1, que estableix interaccions d'apilament hidrofòbic amb la unitat de glucopiranososa que ocupa aquest subseti, per tal d'avaluar la contribució d'aquesta interacció en el mecanisme catalític de l'enzim. Sembla que les interaccions en aquest subseti són claus per tal d'assolir la distorsió del substrat que té lloc en la formació del complex de Michaelis [80, 125, 150, 224, 225]. Complementàriament, i amb la mateixa finalitat, es realitzen anàlisis de Hammett a la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814, en el marc d'una col·laboració amb l'Institut de Biologia Fonamental "Vicent Villar Palasí", de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Finalment, en el setè capítol es presenten algunes propostes d'interpretació del mecanisme enzimàtic deduït per tal d'explicar el conjunt dels resultats cinètics obtinguts al llarg de la present tesi doctoral.

En resum, els objectius de la present tesi doctoral, que es desglossen a partir del capítol 3, són:

- 1.- Estudi de la cinètica de la reacció d'hidratació del glicid G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* i perfil de pH de la reacció.
- 2.- Estudi de la importància de l'hidroxil a C2 en el mecanisme enzimàtic de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.
- 3.- Estudi del mecanisme enzimàtic de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* mitjançant cinètiques enzimàtiques en estat preestacionari.
- 4.- Estudi del mecanisme enzimàtic de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a través de la informació obtinguda a partir d'anàlisis de Hammett.