

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 *Bacillus licheniformis* per mutagènesi dirigida

En el present treball s'han obtingut quatre mutants diferents de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Per a això, primer s'han introduït a nivell d'ADN les mutacions desitjades de manera controlada al gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa. A continuació s'han transformat cèl·lules competents amb els gens que codifiquen per als mutants, i s'han realitzat cultius a escala preparativa per tal d'obtenir en quantitat suficient la proteïna objecte d'estudi. Amb la finalitat de generar les mutacions a nivell d'ADN s'han utilitzat dos mètodes diferents. Tots dos són mètodes de mutagènesi dirigida que es basen en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

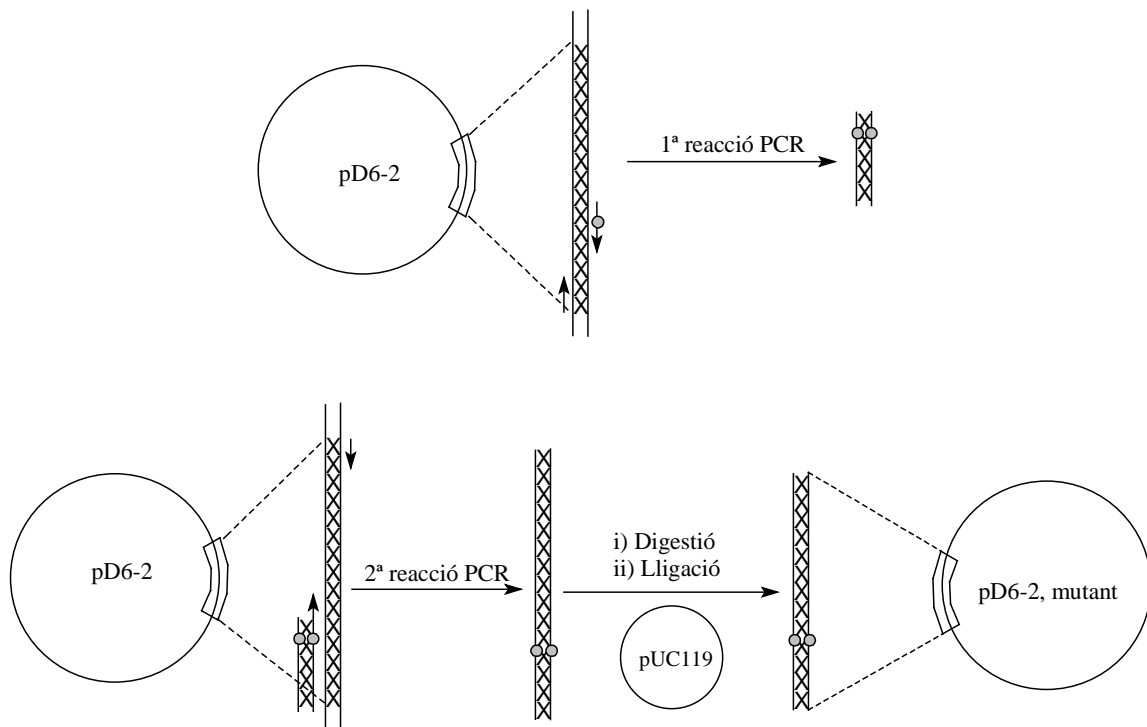


Figura 1.1. Esquema de les etapes per a l'obtenció de mutants, partint del plasmidi que codifica per a l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* fins arribar al plasmidi que codifica per al mutant desitjat, fent servir el mètode posat a punt per Juncosa *et al.* [226]. Els cercles grisos simbolitzen el codó que introdueix la mutació, i el codó complementari.

Per a l'obtenció dels mutants W221F, W221A i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* s'ha adoptat el mètode posat a punt per Juncosa *et al.* [226], que per tal d'obtenir el gen mutat fa servir dues reaccions de PCR acoblades. A la primera reacció s'empren com a encebadors l'oligonucleòtid que introdueix la mutació i un

encebador universal, obtenint com a resultat l'amplificació del fragment d'ADN confinat entre els dos encebadors. Aquest fragment es fa servir com un dels encebadors de la segona reacció de PCR, i amb l'ajuda d'un altre encebador universal s'obté finalment l'amplificació de la seqüència del gen mutat. Un cop mutat el gen d'interès s'obté el plasmidi que codifica per a l'enzim mutat, després d'una etapa de digestió i lligació al plasmidi d'expressió, el pUC119 (figura 1.1). El problema principal d'aquest mètode és l'ajust de la temperatura d'hibridació de la segona reacció de PCR, ja que els fragments d'ADN que fan d'encebadors poden tenir mides molt diferents, i per tal obtenir una bona hibridació de tots dos s'ha de jugar bastant amb la temperatura.

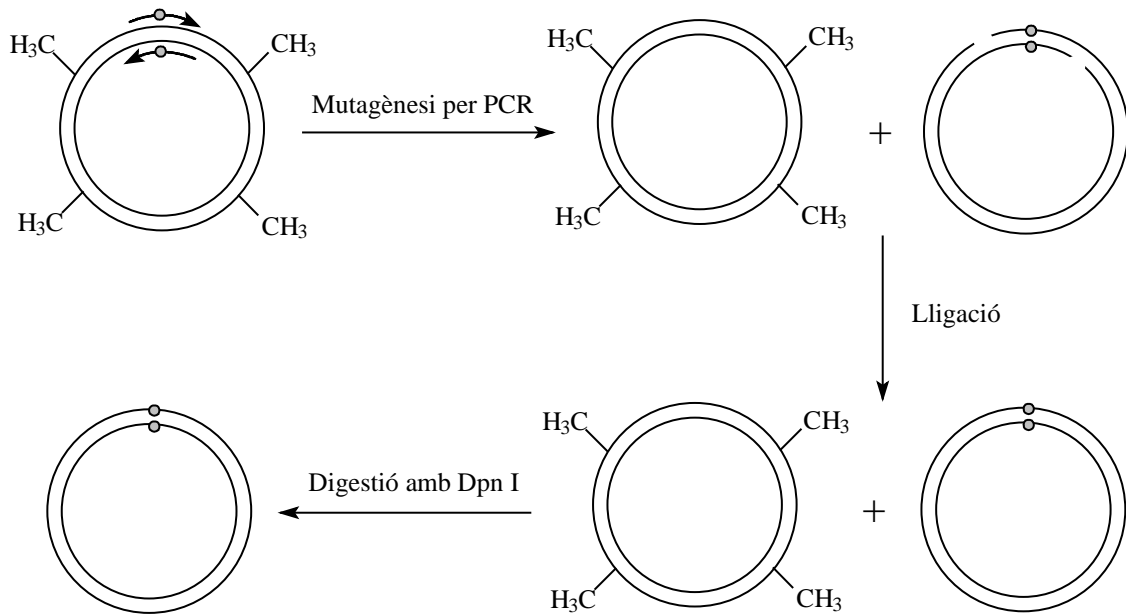


Figura 1.2. Esquema de les etapes per a l'obtenció de mutants, partint del plasmidi d'origen fins arribar al plasmidi que codifica per al mutant desitjat, fent servir el mètode posat a punt per Penalva [227]. Els cercles grisos simbolitzen el codó que introdueix la mutació, i el codó complementari.

El segon mètode que s'ha emprat en el present treball per a l'obtenció de mutants es basa en la millora introduïda per Penalva [227] del mètode proposat per Hemsley *et al.* [228], que permet introduir mutacions puntuals en una única reacció de PCR. Aquest és el mètode que s'ha fet servir per a l'obtenció del mutant Y152F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. En aquest mètode els dos encebadors, que són complementaris, porten el codó que codifica per a la mutació, i en hibridar amb la cadena d'ADN que fa de motlle ho fan amb les seqüències complementàries en cadascuna de les cadenes. D'aquesta forma s'amplifica tot el vector que conté el gen en un únic cicle de PCR. Com les noves cadenes que es generen no estan relligades, no poden servir de motlle en el següent cicle de PCR, de manera que l'ADN motlle de cada cicle és sempre el de partida (figura 1.2). D'aquest fet se'n deriven dues conseqüències importants, d'una banda que l'amplificació de l'ADN és lineal, ja que en cada cicle s'obté el mateix nombre de còpies; i de l'altra, que s'ha de purificar d'alguna manera l'ADN en què s'ha introduït la mutació abans de la transformació cel·lular, ja que el nombre de còpies del vector de partida no és gens menyspreable enfront del nombre de còpies del nou vector mutat. Aquesta purificació consisteix en una lligació de les còpies

del vector mutat per tal de formar un plasmidi estable i a continuació la digestió del cru amb l'enzim de restricció DpnI, que reconeix seqüències metilades que només es troben en l'ADN de partida. Finalment només queda el plasmidi que codifica per a la 1,3-1,4- β -glucanasa mutant amb el que es transformen les cèl·lules hoste.

1.1.1. ADN motlle emprat en l'obtenció dels mutants de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Com a ADN motlle s'ha utilitzat el gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* que s'ha introduït prèviament al plasmidi pUC119, generant d'aquesta manera el plasmidi pD6-2 [192]. La inserció del gen junt amb les seqüències de control originals (promotor i terminador de transcripció) que permeten que pugui expressar-se en *Escherichia coli* s'ha realitzat a la regió del *polylinker* del plasmidi pUC119. L'insert també disposa de la seqüència que codifica per al pèptid senyal de la 1,3-1,4- β -glucanasa que és funcional a *Escherichia coli*, com s'ha pogut comprovar pel fet que la proteïna es trobi majoritàriament a la zona extracel·lular o periplàsmica [192]. Pel que fa a les característiques del plasmidi pCU119 que es conserven al plasmidi pD6-2 destaquen el seu origen de replicació (*oriC*), que permet que s'autorepliqui més ràpidament que l'ADN genòmic, arribant a acumular entre 500 i 700 còpies del plasmidi per cèl·lula; i el gen de resistència a ampicil·lina (*Amp^r*), que permet la selecció de les cèl·lules que contenen el plasmidi en presència d'aquest antibiòtic. D'altra banda, la seqüència de subclonatge on s'insereix el gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa es troba enmig de la seqüència que codifica per a una β -galactosidasa (*LacZ*). Això fa que al plasmidi pD6-2, a diferència del que passa al plasmidi pUC119, no s'expressi la β -galactosidasa. Aquesta és una altra característica que s'aprofita més endavant en la selecció de les cèl·lules transformades.

1.1.2. Encebadors emprats en l'obtenció dels mutants de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Aplicant el mètode de dues PCR acoblades per a l'obtenció dels mutants són necessaris quatre encebadors diferents, un dels quals s'obté com a producte de la primera reacció de PCR. Els altres tres són l'oligonucleòtid mutagènic, que s'ha de dissenyar específicament per a cada mutació, el *FUP* (*Forward Universal Primer*) i el *RUP* (*Reverse Universal Primer*). El *FUP* i el *RUP* són dos oligonucleòtids de 17 i 16 bases, que hibriden, el *FUP* amb la cadena codificant del plasmidi al final del gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa, i el *RUP* amb la cadena no codificant abans del principi del gen (figura 1.3). La tria de l'encebador universal que s'empra a la primera reacció de PCR, la marca la posició del residu a mutar dins del gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa. De manera que entre els dos encebadors universals, s'escull aquell que, junt amb l'encebador mutagènic, generi el fragment d'ADN més curt, per acció de la polimerasa. Com tant el residu W221 com el Y152 es troben a la segona meitat del gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa, a la primera reacció de PCR s'ha fet servir el *FUP* en tots dos casos i com a conseqüència s'ha dissenyat l'oligonucleòtid mutagènic complementari a la cadena no codificant.

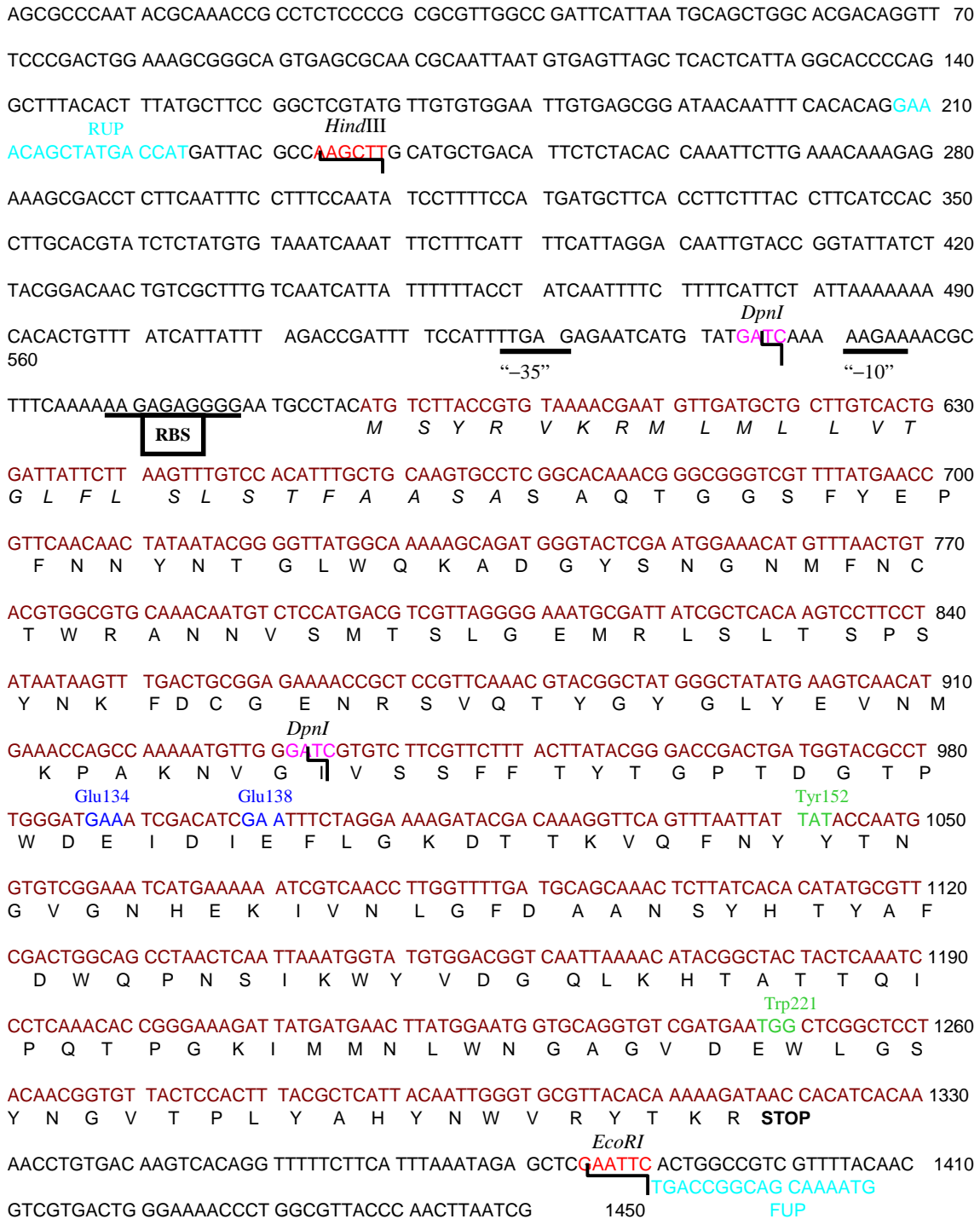


Figura 1.3. Fragment de la seqüència d'ADN del plasmidi pD6-2 que inclou el gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. S'indiquen el promotor i el terminador de transcripció, a “-10” i “-35” bases del RBS (que és el punt d'ancoratge del ribosoma a l'ARN a l'inici de la transcripció), el RBS, la seqüència dels oligonucleòtids *FUP* i *RUP* (en blau clar) i els llocs de tall dels enzims *EcoRI* i *HindIII* (en vermell) i *DpnI* (en rosa). També s'indica la traducció a aminoàcids, on el pèptid senyal eliminat en la proteïna madura es marca en cursiva, els residus essencials Glu134 i Glu138 són en blau i els residus que s'estudien en el present treball, la Tyr152 i el Trp221, en verd.

En el disseny dels oligonucleòtids mutagènics s'ha mirat d'introduir alguna nova diana de restricció per tal de poder detectar d'una manera senzilla la mutació introduïda.

D'aquesta manera es pot realitzar el control de l'etapa de mutagènesi en digerir amb els enzims de restricció adients, emprant tècniques analítiques d'electroforesi d'ADN.

Taula 1.1. Seqüències dels oligonucleòtids mutagènics emprats per a l'obtenció dels mutants W221F, W221A i Y152A; i dianes que es fan servir per al control de l'etapa de mutagènesi.

mutant	Oligonucleòtid mutagènic	Dianes per a detecció
W221F	5'-GCA GGT GTC GAT GAA TTC CTC GGC TCC TAC A-3'	EcoRI / HindIII
W221A	5'-GCA GGT GTC GAT GAA GCG CTC GGC TCC TAC A-3'	HaeII
Y152A	5'-T CAG TTT AAT TAT GCT ACC AAT GGT GTC GG-3'	No genera noves dianes

Per al mutant Y152F, que s'obté aplicant el mètode d'una única PCR només es fan servir dos encebadors, que són dos encebadors mutagènics complementaris. Com no s'introdueix cap nova diana de restricció no es pot realitzar el control de la reacció de mutagènesi.

Encebador 1	5' T CAG TTT AAT TAT TTC ACC AAT GGT GTC GG 3'
Encebador 2	5' CC GAC ACC ATT GGT GAA ATA ATT AAA CTG A 3'

1.1.3. Obtenció del plasmidi pD6-2 dels mutants W221F, W221A i Y152A emprant el mètode amb dues etapes de PCR consecutives

1.1.3.1. Obtenció de l'ADN dels mutants W221F, W221A i Y152A de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*

A la figura 1.4 es mostra l'esquema de les etapes que s'han seguit per a l'obtenció dels mutants W221F, W221A i Y152A. Aquest esquema general es basa en el mètode desenvolupat prèviament a l'equip [226], tanmateix en el present treball s'han canviat una sèrie de variables:

Polimerasa d'ADN. La polimerasa emprada en el mètode general és la polimerasa DeepVent[®] de *Pyrococcus furiosus* sp. GB-D, que presenta activitat correctora de prova (3'→5' exonucleasa), augmentant d'aquesta forma la fiabilitat de la còpia, però que és molt sensible a les condicions de reacció i a la puresa de l'ADN. Per a l'obtenció dels mutants del Trp221 s'ha decidit treballar amb la polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*, que és 10 vegades menys fiable [195], ja que no té activitat 3'→5' exo, però que després de diverses proves es comprova que dona millors resultats en les condicions emprades. En el cas del mutant de la Tyr152 els resultats obtinguts amb un enzim o l'altre enzim són bastant similars, i només varien les condicions del cicle de temperatura.

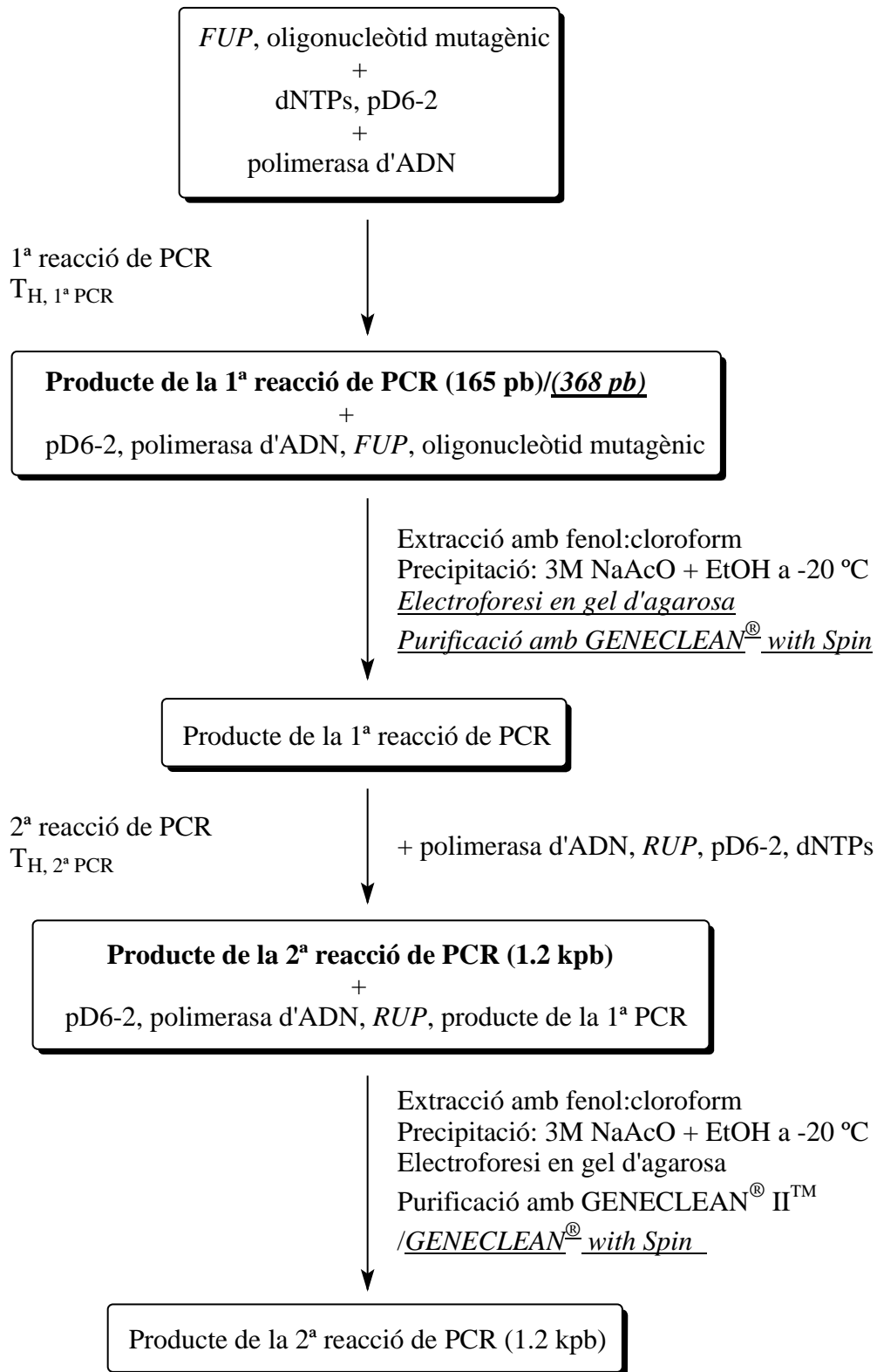


Figura 1.4. Esquema general aplicat a l'obtenció de l'ADN dels mutants W221F, W221A i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. En lletra estàndard es presenta el procediment emprat en el cas dels mutants en la posició 221 i en cursiva i subratllat s'indiquen les variacions introduïdes en el cas del mutant Y152A.

Temperatura d'hibridació. Per a l'obtenció dels mutants W221F i W221A la temperatura d'hibridació de la primera reacció de PCR és la descrita en l'article [226], 55 °C, i la de la segona reacció s'ha ajustat a 44 °C i 45 °C, respectivament. Per al mutant Y152A la temperatura d'hibridació de la primera reacció de PCR s'ha ajustat a 41 °C en el cas de fer servir la polimerasa DeepVent[®], i a 43 °C en fer servir la polimerasa Taq; mentre que la reacció d'hibridació per a la segona reacció de PCR ha estat de 42.2 °C independentment de la polimerasa emprada.

Purificació de l'oligonucleòtid mutat producte de la primera PCR. El procediment general per a la purificació de l'ADN que s'obté d'una reacció de PCR consta de quatre etapes: extracció de les proteïnes del medi amb una barreja fenol/cloroform, precipitació de l'ADN amb alcohol i posterior selecció del fragment desitjat en un gel d'agarosa i purificació del fragment en qüestió. El que s'ha vist en el cas dels mutants en la posició 221, és que quan es purifica d'aquesta manera l'oligonucleòtid mutat producte de la primera reacció de PCR, no s'obtenen bons resultats en la segona PCR. Com a conseqüència, a la segona reacció de PCR s'ha decidit treballar amb la barreja d'ADN procedent de la primera reacció de PCR, que s'ha obtingut després de la precipitació amb etanol, sense purificar l'oligonucleòtid mutat. Per al mutant Y152A, sí que s'ha realitzat el procés sencer, ja que en comptes d'obtenir un únic fragment de 368 pb com hauria estat d'esperar després de la primera reacció de PCR, se n'obtenen dos d'entre 300 i 400 pb. Per tant, després de la precipitació amb etanol es fa una electroforesi preparativa en gel d'agarosa, se separa la banda d'interès (superior i més intensa), i es purifica amb el *kit* comercial GENE CLEAN[®] with Spin.

1.1.3.2. Subclonatge en el vector d'expressió pUC119

Un cop obtingut l'ADN dels mutants la següent etapa és la seva introducció en el vector que es fa servir per a l'expressió de la proteïna. Per al subclonatge es fa servir el vector pUC119. Les etapes seguides en el procés de subclonatge es mostren a la figura 1.5. Es digereixen per separat el vector d'expressió, pUC119, i el fragment d'oligonucleòtids mutat, que s'ha obtingut de la segona reacció de PCR, amb les mateixes endonucleases de restricció. Per als mutants W221A i Y152A s'han utilitzat les endonucleases EcoRI i HindIII, però per al mutant W221F, com l'oligonucleòtid que introdueix la mutació a la primera reacció de PCR conté una diana per a l'endonucleasa EcoRI, s'han fet servir les endonucleases SacI i HindIII. Un cop purificats els fragments digerits, s'ha dut a terme la lligació fent servir la lligasa d'ADN T4. Com el vector d'expressió també pot relligar sense haver incorporat el gen mutat, és aconsellable que la proporció de gen digerit sigui superior a la del vector d'expressió per tal de potenciar la inserció del gen d'interès. En el cas dels mutants del Trp221 aquesta relació ha estat de 5:1 per al W221A i de 1:1 per al W221F, i per al mutant de la Tyr152 ha estat de 3:1. A continuació amb els vectors que han incorporat la mutació, anomenats pD6-2 W221F, pD6-2 W221A i pD6-2 Y152A, respectivament, es transformen les cèl·lules hoste seleccionades per tal d'expressar la proteïna.

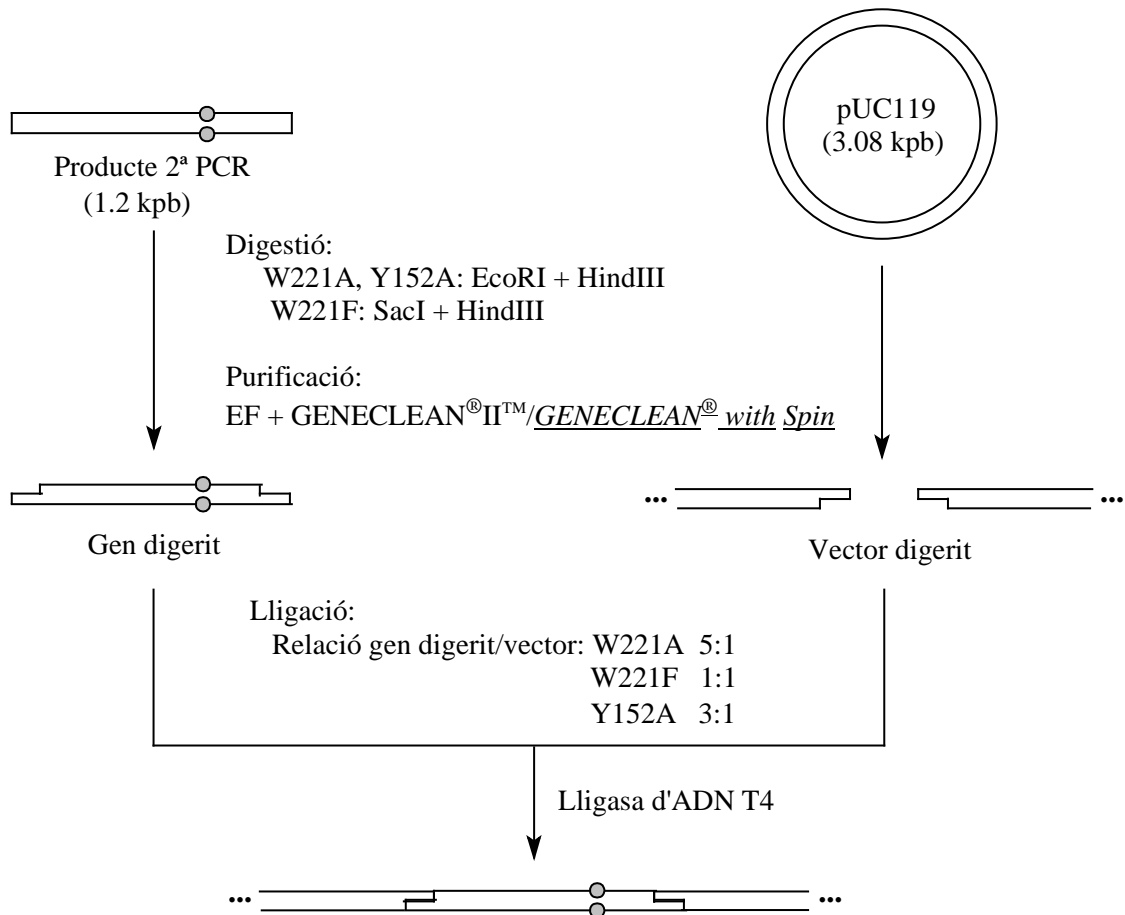


Figura 1.5. Esquema de les etapes de subclonatge del gen mutat de la 1,3-1,4- β -glucanasa en el vector d'expressió pUC119 (en lletra cursiva i subratllat s'indica la variació introduïda en el cas del mutant Y152A). Els cercles grisos representen la mutació.

1.1.4. Obtenció del plasmidi pD6-2 del mutant Y152F emprant el mètode amb una única etapa de PCR

Els punts clau que s'han d'ajustar emprant aquest mètode són la temperatura d'hibridació dels encebadors i la concentració d'ions magnesi, necessària perquè es doni la reacció. D'un marge entre 2 i 12 mM MgSO₄ els millors resultats s'han obtingut a una concentració de 4 mM. La temperatura d'hibridació s'ha ajustat a 58 °C. Com que el fragment d'ADN que s'ha d'amplificar en aquest cas és tot el plasmidi, que té una longitud de 4.2 kb, el temps d'elongació és considerable. S'ha descrit [228] que per sota dels 12 minuts el nombre de fragments de longitud inferior a la de l'ADN motlle és significatiu, per tant s'ha decidit aplicar un temps d'elongació de 15 minuts. I donat que l'amplificació de l'ADN emprant aquest mètode és lineal s'ha partit d'una concentració elevada d'ADN motlle.

En aquests experiments també s'ha assajat la incorporació del mètode d'inici en calent (de l'anglès *hot start*) per a la reacció de PCR. Aquest mètode consisteix en separar l'alíquota de polimerasa d'ADN de la resta de components de la barreja de reacció amb una capa de cera que fon a prop dels 94 °C. D'aquesta manera es disminueix la

degradació dels encebadors conseqüència de l'activitat 3'→5' exonucleasa pròpia de la polimerasa d'ADN i la formació de còpies errònies producte d'hibridacions inespecífiques dels encebadors amb l'ADN motlle que es donen durant la rampa inicial de temperatura en la primera etapa de PCR. Aquestes còpies errònies poden servir d'encebadors en etapes de PCR posteriors donant lloc a l'amplificació de fragments no desitjats. Tot i la incorporació d'aquesta tècnica encara s'han amplificat molts fragments indesitjats, cosa que ha portat a l'estudi d'una variant del mètode [229], en què a més a més de la polimerasa d'ADN, un dels encebadors també està separat de la resta de components de la barreja. Els resultats obtinguts en aquest cas comporten una gran disminució en el nombre de bandes que s'observen en l'electroforesi posterior.

Les cadenes que contenen la mutació generades de nou tenen una osca (de l'anglès *nick*) i per tal de millorar la seva estabilitat i el rendiment del procés de transformació interessa fer la lligació de les cadenes, pel que s'ha emprat la lligasa d'ADN T4 sobre el producte de PCR purificat i concentrat. A continuació, amb el propòsit d'eliminar l'ADN que codifica per a l'enzim salvatge, s'ha fet servir l'enzim de restricció DpnI, que reconeix específicament l'ADN que s'ha fet servir de motlle i l'hidrolitza. Aquest reconeixement selectiu es basa en la capacitat d'aquesta endonucleasa de reconèixer seqüències d'ADN metilades. A la natura molts organismes fan servir la metilació de bases dins d'una seqüència d'ADN específica, com a mecanisme de diferenciació del material genètic propi enfront de l'exogen. Enfront d'un atac, els enzims de restricció corresponents reconeixen les seqüències metilades i hidrolitzen aquelles que no es corresponen amb l'ADN propi. La DpnI és una d'aquestes endonucleases, i actua sobre la seqüència 5' GA^mTC 3', pròpia de l'ADN de la 1,3-1,4-β-glucanasa expressada *in vivo* i feta servir com a motlle.

1.1.5. Transformació i selecció dels clons que incorporen les 1,3-1,4-β-glucanases mutades

1.1.5.1. Transformació de cèl·lules hoste

La transformació de cèl·lules hoste amb els plasmidis obtinguts en el subclonatge permet l'obtenció de clons que expressen, entre altres proteïnes, les 1,3-1,4-β-glucanases mutades. La transformació s'ha dut a terme fent servir les cèl·lules competents d'*Escherichia coli*, prèviament tractades amb CaCl₂ per tal de permeabilitzar la membrana cel·lular a l'entrada d'ADN plasmídic. Un cop transformades aquestes cèl·lules es fan créixer en un medi sòlid suplementat amb ampicil·lina.

Les cèl·lules transformades han incorporat l'ADN obtingut en el procés de lligació, però aquest ADN no respon al 100% a l'ADN mutat d'interès. Entre les possibilitats es pot trobar el plasmidi relligat, el plasmidi que ha incorporat l'ADN de l'enzim salvatge, fet servir com a motlle en el procés de mutagènesi dirigida, i l'ADN del mutant. Això obliga a realitzar una selecció de les colònies transformades per tal d'estar segurs que la colònia triada expressa la proteïna desitjada abans de fer l'expressió a gran escala.

1.1.5.2. *Selecció de clons que expressin els mutants*

La selecció dels mutants s'ha realitzat a tres nivells: selecció de la inserció del gen, selecció per activitat i anàlisi de restricció. La darrera comprovació s'ha realitzat quan ja s'ha escollit la colònia que es vol fer créixer a nivell preparatiu, per seqüenciació del gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa amb la finalitat d'assegurar la presència de la mutació desitjada i l'absència d'altres mutacions.

Selecció dels clons amb la inserció del gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa

Aquesta primera selecció es realitza a dos nivells, d'una banda per creixement dels clons de cèl·lules que s'han transformat enfront dels que no s'han transformat, i d'altra banda per tria posterior dels clons transformats amb el plasmidi pUC119, que no ha incorporat el gen, enfront dels transformats amb el plasmidi pD6-2 del mutant corresponent.

Per a la selecció dels clons transformats s'han fet créixer les cèl·lules en presència d'ampicil·lina. Com les cèl·lules competents no tenen el gen de resistència a ampicil·lina (*Amp^r*), només creixen les cèl·lules que s'han transformat amb el plasmidi pUC119 o pD6-2 corresponent. Entre els clons transformats, per tal de diferenciar els que només han incorporat el plasmidi pUC119 dels que han incorporat el plasmidi amb el gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa inserit, s'ha suplementat el medi de cultiu amb IPTG i X-Gal. Aquests compostos són l'inductor i el substrat, respectivament, d'una β -galactosidasa que està codificada al plasmidi pUC119. Donat que la inserció del gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa es realitza enmig de la seqüència que codifica per al gen d'aquesta β -galactosidasa, la presència de l'insert interromp la seva expressió. Aquelles colònies capaces d'hidrolitzar l'X-Gal generen un cromòfor blau, i són les que s'han transformat amb el vector pUC119 relligat, mentre que les que expressen la 1,3-1,4- β -glucanasa són incapaces d'hidrolitzar l'X-Gal, i són de color blanc. Arribats a aquest punt cal fer una apreciació, l'assaig amb IPTG i X-Gal només permet distingir els plasmidis que s'han relligat intramolecularment, ja que apart dels plasmidis que incorporen el gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa, els fragments de pUC119 que relliguen intermolecularment, també poden donar lloc a colònies blanques.

Selecció per l'activitat 1,3-1,4- β -glucanasa

Una selecció per activitat permet distingir inequívocament els clons que han incorporat el gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa a no ser que s'expressi un mutant inactiu, tot i que, a priori, no permet distingir entre el gen de l'enzim salvatge i el del mutant.

En aquest cas, la sembra de la placa de cultiu es fa per duplicat seguint unes plantilles. Mentre que una de les plaques només conté el medi de cultiu suplementat amb ampicil·lina, que és la placa a partir de la qual se selecciona la colònia per tal de realitzar el creixement a escala preparativa; l'altra placa, està suplementada a més, amb un substrat natural de la 1,3-1,4- β -glucanasa, i en aquesta segona placa és en la que es duu a terme l'assaig d'activitat. El colorant Roig Congo tenyeix d'un vermell intens els polisacàrids, però a mesura que el substrat és hidrolitzat per l'enzim els fragments

d'oligosacàrid són cada cop de menor pes molecular, i la tinció perd intensitat fins desaparèixer. Com les colònies que expressen la 1,3-1,4- β -glucanasa la van exportant al medi extracel·lular al llarg del seu creixement, és fàcil distingir-les per la formació d'un halo que permet observar el color del medi de cultiu, a diferència de les colònies que no expressen l'enzim i que queden totalment tenyides de vermell. Com a exemple, a la figura 1.6 es mostren les plaques d'activitat obtingudes per als mutants W221F i W221A.

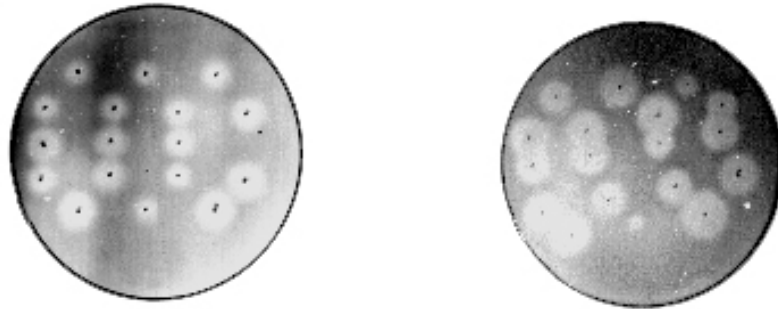


Figura 1.6. Plaques d'activitat de les colònies transformades amb els plasmidis pD6-2 W221A (esquerra) i pD6-2 W221F (dreta). Els halos centrats en els clons indiquen degradació del substrat natural de la 1,3-1,4- β -glucanasa.

Amb la placa d'activitat es fa palesa la presència de les colònies que presenten activitat 1,3-1,4- β -glucanasa i, fent servir la plantilla, s'han escollit les colònies de la placa mestra (placa que no conté substrat) que s'han fet servir per al subseqüent anàlisi de restricció i seqüenciació.

Dels quatre mutants, tots han presentat plaques d'activitat on s'observa la presència d'halos d'activitat 1,3-1,4- β -glucanasa, tret del mutant Y152F. En aquest cas no s'ha observat cap colònia amb activitat. Donat que les colònies seleccionades es fan créixer en un medi suplementat amb ampicil·lina, i en l'assaig amb IPTG i X-Gal apareixen com a colònies blanques, hi ha dues possibilitats: o bé el mutant Y152F és inactiu, o bé la 1,3-1,4- β -glucanasa corresponent a aquest mutant s'expressa intracel·lularment de forma majoritària. La primera opció no és gaire probable si es té en compte l'elevada similitud de seqüències entre la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* i la de *Bacillus macerans*, ja que el mutant corresponent de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus macerans* tot i ser menys actiu que l'enzim salvatge, no és inactiu [212]. Més endavant, a l'etapa de purificació de la 1,3-1,4- β -glucanasa es comprova que el mutant Y152F s'expressa a *Escherichia coli* bàsicament com una proteïna intracel·lular.

Selecció per digestió amb enzims de restricció

A fi de diferenciar d'entre els clons seleccionats els que expressen l'enzim salvatge dels que expressen el mutant desitjat, es realitza una etapa en què es digereix l'ADN dels clons seleccionats amb els enzims de restricció que reconeixen les noves dianes generades en introduir la mutació. Aquest és el segon punt del procés en què s'aprofita el fet que l'oligonucleòtid mutagènic introdueixi una nova diana de restricció. Com en el cas dels mutants en la posició 152 no s'ha introduït ni eliminat cap diana de

restricció, aquesta anàlisi prèvia només s'ha realitzat amb els mutants en la posició 221, i per a la resta s'ha hagut de recórrer directament a la seqüenciació del gen.

Per a cadascun dels mutants en la posició 221 se seleccionen diferents clons, s'obté l'ADN de cadascun a petita escala i es digereix amb els enzims de restricció corresponents. En el cas del mutant W221F la utilització de la combinació d'enzims EcoRI i HindIII, ha permès identificar l'ADN del mutant ja que un fragment de 1.14 kpb en l'ADN de l'enzim salvatge, es fragmenta en dos trossos de 1.01 i 0.3 kpb en l'ADN del mutant. Per al mutant W221A la utilització de l'enzim de restricció HaeII ha permès diferenciar l'ADN de l'enzim salvatge que presenta un fragment de 1.5 kpb, del del mutant, en què aquest fragment es divideix en un de 1.3 kpb i un altre de 0.2 kpb. A més, en els dos casos s'ha realitzat una linealització del plasmidi amb l'enzim HindIII per tal de comprovar que la seva longitud sigui de 4.2 kpb, com correspon.

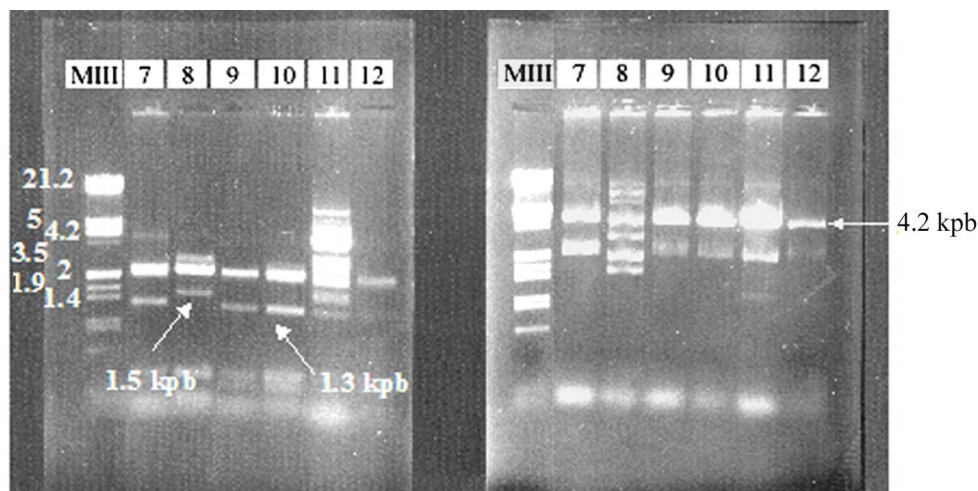


Figura 1.7. Gels d'agarosa dels fragments de la digestió amb HaeII (esquerra) i HindIII (dreta) de l'ADN procedent d'uns clons, prèviament seleccionats per activitat, producte de la transformació amb el producte de lligació del plasmidi pUC119 amb el gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, obtingut en la reacció de mutagènesi dirigida per tal de formar el mutant W221A. El número de carril indica la colònia de la placa mestra seleccionada. Com a referència, es fa servir el marcador MIII, al costat s'indica la longitud d'alguns dels fragments del marcador en kpb.

A la figura 1.7 es mostren els gels d'agarosa dels fragments obtinguts amb la digestió amb els enzims HaeII (esquerra) i HindIII (dreta) de l'ADN dels clons, seleccionats per activitat, que haurien d'expressar el mutant W221A. En la digestió amb HindIII s'observa que la linealització del plasmidi rendeix el producte de 4.2 kpb que correspon al plasmidi pD6-2. En la digestió amb HaeII es comprova que entre els clons actius procedents de la selecció del mutant W221A n'hi ha alguns que corresponen a l'enzim salvatge, com es mostra al carril 8, tot i que la majoria corresponen al mutant desitjat. Amb l'objectiu de confirmar la mutació s'ha obtingut l'ADN a mitja escala a partir d'una de les colònies que expressa el mutant i s'ha seqüenciat el gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa.

1.2. Seqüenciació dels gens mutats

1.2.1. Obtenció de l'ADN per a la seqüenciació

Per tal d'obtenir l'ADN necessari per a dur a terme la seqüenciació s'han realitzat cultius en medi líquid dels clons seleccionats i s'han lissat les cèl·lules amb una dissolució bàsica de SDS. A les condicions emprades en la lisi cel·lular a més de trencar la membrana cel·lular, s'hidrolitza l'ARN i es desnaturalitzen les proteïnes i l'ADN. Per tant s'ha de tenir un bon control del temps de lisi per arribar a un compromís entre l'alliberament de l'ADN plasmídic i la seva desnaturalització. A continuació s'ha portat el medi fins a pH 5 provocant la precipitació de les proteïnes desnaturalitzades, l'ADN cromosòmic, i gran part del SDS.

A partir d'aquest punt s'han aplicat diferents metodologies per a l'obtenció de l'ADN pur. En el cas dels mutants W221A i W221F s'ha emprat una columna d'exclusió molecular per tal d'eliminar les restes d'ADN genòmic. L'ADN plasmídic de la resta dels mutants s'ha purificat per cromatografia de bescanvi iònic, amb una fase sòlida funcionalitzada amb grups dietilaminoetil (DEAE). Els grups fosfat de l'ADN i l'ARN interaccionen amb els grups dietilaminoetil de la reïna en funció del pH i de la força iònica. A una força iònica baixa, l'ARN elueix junt amb les proteïnes, carbohidrats i petits metabòlits que puguin quedar, mentre que l'ADN queda unit a la reïna. L'ADN plasmídic s'elueix augmentant la força iònica del tampó, i se separa de les restes d'ADN cromosòmic que resten ancorades a la columna, i que necessiten d'un tampó de força iònica encara major per tal d'eluir-se. Finalment, en qualsevol dels casos, l'ADN plasmídic s'ha precipitat amb etanol.

1.2.2. Seqüenciació dels gens

Per a la seqüenciació dels gens s'ha utilitzat el *kit* comercial Bigdye™ Terminator, que és una variant del mètode de Sanger que incorpora marcadors de fluorescència, estalviant la necessitat de treballar amb radioactivitat. A més, el mètode està adaptat per tal d'emprar la reacció de PCR, de manera que n'hi ha prou amb 100 ng de l'ADN que es fa servir com a motlle. I com cada ddNTP porta incorporat un marcador de fluorescència diferent, es pot seqüenciar el gen amb una única reacció de PCR.

Com en el cas dels mutants Y152A i Y152F no s'ha pogut realitzar l'etapa prèvia de selecció del mutant per anàlisi de restricció, per a cada mutant s'han realitzat diferents seqüenciacions amb l'ADN procedent de diverses colònies seleccionades en la placa d'activitat. Amb l'ADN plasmídic purificat s'han dut a terme les diferents reaccions de seqüenciació utilitzant la polimerasa DeepVent® i els encebadors *FUP* o *RUP* per separat, en cada reacció de PCR. Cada reacció de seqüenciació permet elongar la cadena entre 500 i 600 bases, de manera que amb els dos encebadors, que hibriden cadascun a un extrem del gen de la 1,3-1,4- β -glucanasa, s'ha pogut realitzar la lectura completa del gen. Un cop finalitzada la reacció i eliminat l'excés de ddNTP no incorporats, s'ha enviat l'ADN obtingut al Servei Científic-Tècnic de la Universitat de Barcelona, on després d'una electroforesi es realitza la lectura del gel amb un detector de fluorescència.

Per a la posterior expressió de la proteïna mutada s'han escollit els clons en els que a la seqüència d'ADN de la 1,3-1,4- β -glucanasa hi ha la mutació desitjada, i que no presenta altres mutacions indesitjades. En tots els clons seqüenciats d'aquesta manera s'observa una inserció de 10 pb situada a la zona anterior al promotor, que no afecta per a res a l'expressió de la proteïna.

1.3. Expressió i purificació de l'enzim salvatge i els mutants obtinguts de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

1.3.1. Expressió dels enzims

A partir del cultiu en placa de Petri del clon d'*Escherichia coli* seleccionat en cada cas s'ha fet un cultiu líquid en matràs d'Erlenmeyer, que ha servit per tal d'inocular el cultiu cel·lular a escala preparativa que s'ha dut a terme en un biorreactor. Per al creixement cel·lular s'ha fet servir un medi ric suplementat amb ampicil·lina, per tal d'exercir una selecció positiva sobre el creixement de les cèl·lules d'interès. El fet d'emprar un biorreactor permet una aportació d'oxigen controlada al llarg del temps, que millora el creixement cel·lular, i com a conseqüència l'expressió de les proteïnes, i permet fixar el pH i temperatura als valors desitjats, que són de 37 °C i pH 7.2 [230]. El creixement bacterià arriba a l'estat estacionari cap a les 7 hores de cultiu, però l'expressió de la 1,3-1,4- β -glucanasa no és màxima fins a les 20 hores, i com s'ha comprovat que en cultius encara més llargs se segrega al medi una proteïna d'*Escherichia coli* que interfereix en les etapes posteriors de purificació [230], els diferents cultius s'han aturat al voltant de les 20 hores. El fet d'expressar les diferents 1,3-1,4- β -glucanases en un organisme hoste fent servir com a vehicle d'expressió un plasmidi, permet la sobreexpressió de la proteïna d'interès. Aquesta sobreexpressió, que no es donaria si la 1,3-1,4- β -glucanasa s'hagués expressat en el seu organisme progenitor, facilita molt la seva posterior purificació.

1.3.2. Purificació dels enzims

La purificació de la 1,3-1,4- β -glucanasa s'ha iniciat amb la separació del medi extracel·lular del botó cel·lular en una etapa de centrifugació. L'enzim salvatge i la majoria dels mutants se secreten majoritàriament al medi extracel·lular, de manera que la proteïna sol purificar-se a partir d'aquesta fracció. El mutant Y152F és una excepció, ja que el 95% de la 1,3-1,4- β -glucanasa es troba a la fracció intracel·lular. De manera que, en alguns casos, i especialment en el del mutant Y152F, s'ha processat el botó cel·lular. El tractament d'aquest botó cel·lular s'inicia amb una etapa de lisi cel·lular i a continuació es realitza una precipitació massiva de proteïnes d'*Escherichia coli* a pH 5.5. El sobrenedant així obtingut pot processar-se de la mateixa manera que l'extracte extracel·lular, entrant a l'esquema de purificació (figura 1.8) a la primera etapa de diàlisi a fi d'ajustar les condicions per a la primera etapa cromatogràfica. A l'esquema que es presenta a la figura 1.8 es mostren les diferents etapes de purificació de la 1,3-1,4- β -glucanasa, que són igualment aplicables a l'extracte extracel·lular i a l'intracel·lular. Les principals són les dues etapes cromatogràfiques, una de bescanvi catiònic i l'altra de gel filtració, i la resta d'etapes intermèdies només serveixen per tal d'ajustar les condicions apropiades abans de realitzar les etapes cromatogràfiques. Tot el procés s'ha realitzat a

4 °C per tal de minimitzar la hidròlisi de la 1,3-1,4- β -glucanasa per part de les proteases del medi.

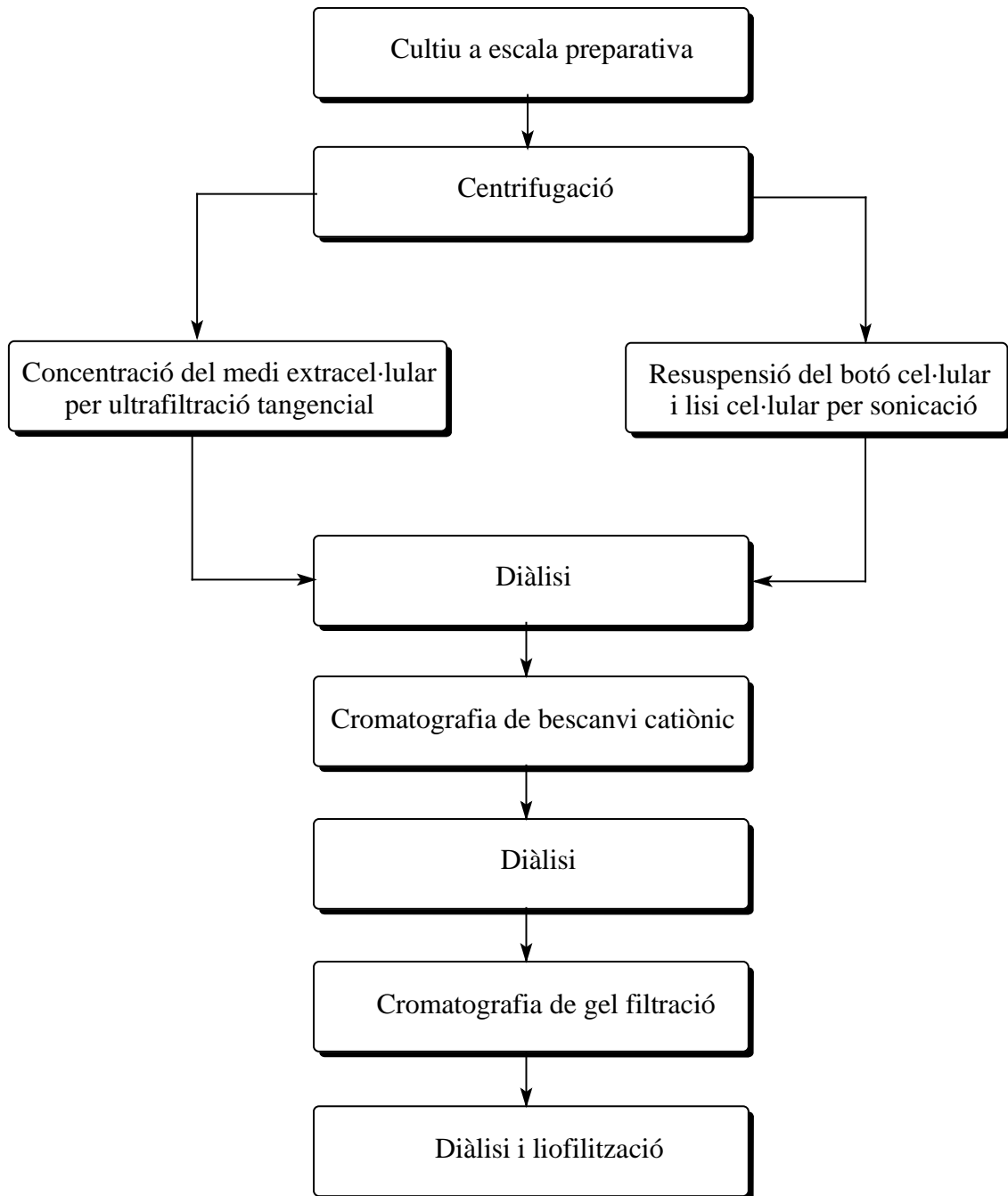


Figura 1.8. Esquema de les etapes de purificació de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

A mode d'exemple s'incorporen a l'explicació de les etapes de purificació, els resultats obtinguts en el cas del mutant W221A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. El medi extracel·lular s'ha concentrat per ultrafiltració tangencial utilitzant una membrana de mida de porus de 10000 Da i posteriorment s'ha dialitzat enfront de tampó NaAcO de baixa força iònica a pH 5.5. En aquestes condicions

precipiten la majoria de proteïnes d'*Escherichia coli* presents en el medi, que tenen un punt isoelèctric proper a pH 5.5. La 1,3-1,4- β -glucanasa té un punt isoelèctric de 8.5 [169], de manera que en aquestes condicions es troba carregada positivament i es manté en solució. Després d'una etapa de centrifugació per tal d'eliminar el precipitat, s'ha realitzat una cromatografia de bescanvi catiònic amb una reïna substituïda amb grups sulfonat, que s'elueix augmentant de forma gradual la força iònica del tampó mantenint sempre el pH a 5.5. En aquestes condicions les proteïnes s'elueixen per ordre ascendent de punt isoelèctric. L'evolució de la separació cromatogràfica se segueix per determinació de l'absorbància a 280 nm en continu i per anàlisi per electroforesi d'acrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) d'algunes de les fraccions de columna.

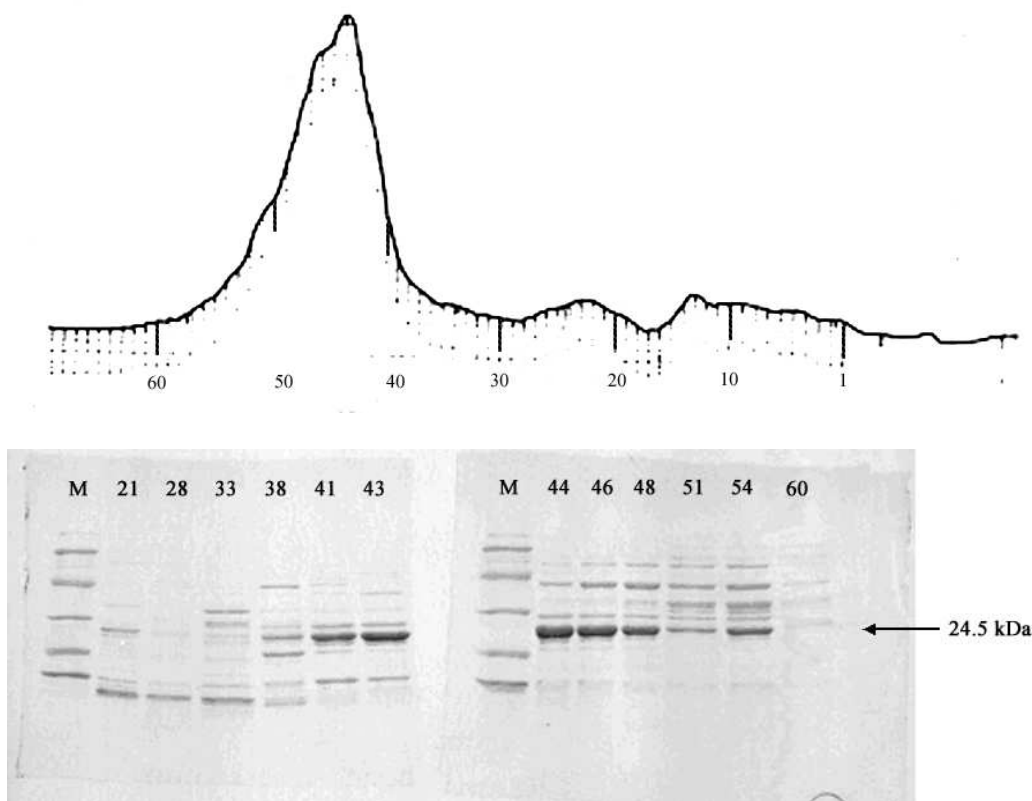


Figura 1.9. Cromatograma de l'elució de la columna de bescanvi catiònic de la purificació del mutant W221A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (a dalt). Gels d'electroforesi d'algunes fraccions obtingudes en aquesta etapa de purificació (a baix). En el primer carril de cada gel es fa servir com a control, el marcador de pesos moleculars *Molecular Weight Standard Low Range* de la casa Bio-Rad. Els números que hi ha tant al cromatograma, com a la part superior de cada carril dels gels d'electroforesi, corresponen al número de fracció recollida a la cromatografia. Amb una fletxa s'indica la banda de 24.5 kDa, que és el pes molecular de la 1,3-1,4- β -glucanasa.

En l'elució de la cromatografia de bescanvi catiònic per al mutant W221A (figura 1.9) es comprova que hi ha un pic majoritari, però el gel d'electroforesi posterior indica que junt amb la 1,3-1,4- β -glucanasa elueixen diverses proteïnes més, la majoria de les quals tenen un pes molecular major. En aquest cas s'han recombinat les fraccions compreses entre la 38 i la 56, per tal de continuar purificant-les a la següent etapa cromatogràfica.

Després de recombinar les fraccions d'interès es dialitzen enfront de tampó 5 mM NaAcO pH 6.0, i en presència de CaCl_2 . Tant la disminució de la força iònica com el lleuger augment de pH i l'addició d'ions Ca^{2+} tenen el propòsit d'augmentar l'estabilitat de la 1,3-1,4- β -glucanasa durant el procés de purificació. La següent etapa de purificació és una cromatografia de gel filtració fent servir una reïna que permet la separació de molècules dins del marge de 3000 a 70000 Da. Les molècules de mida molecular superior són massa grans per entrar dins dels porus de la reïna i són les primeres en eluir; i les de mida inferior a 3000 Da són massa petites com per poder-les distingir amb aquesta mida de porus i són les darreres en eluir. L'elució de la columna es controla de la mateixa manera que en l'etapa cromatogràfica anterior.

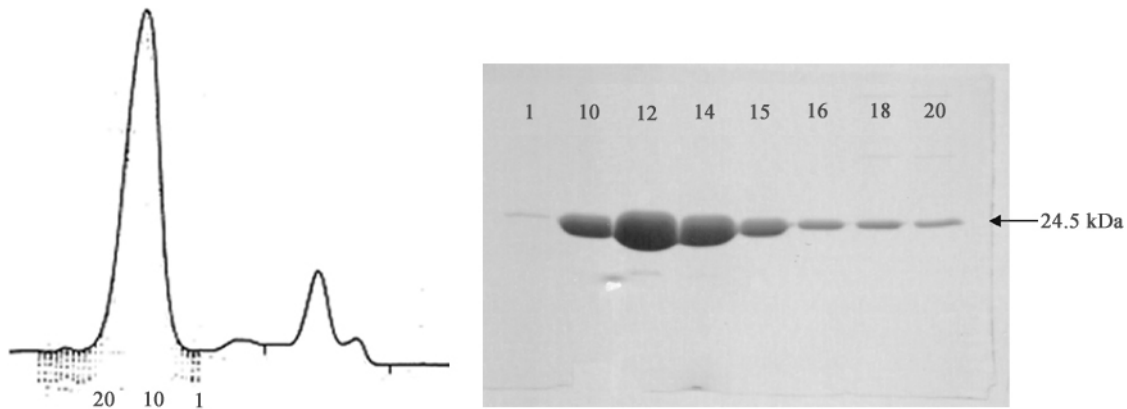


Figura 1.10. Cromatograma de l'elució de la columna de gel filtració de la purificació del mutant W221A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (esquerra). Gel d'electroforesi d'algunes fraccions obtingudes en aquesta etapa de purificació (dreta). Els números que hi ha tant al cromatograma, com a la part superior de cada carril dels gels d'electroforesi, corresponen al número de fracció recollida a la cromatografia. Amb una fletxa s'indica la banda de 24.5 kDa, que és el pes molecular de la 1,3-1,4- β -glucanasa.

A la figura 1.10 s'observa com a la segona etapa cromatogràfica s'aconsegueix separar la 1,3-1,4- β -glucanasa de la resta de proteïnes amb una puresa molt elevada. Després de recombinar les fraccions de la 1,3-1,4- β -glucanasa amb una puresa superior al 90%, detectada per electroforesi, es dialitza la dissolució enfront de tampó MOPS a pH 7 i posteriorment enfront d'aigua Milli-Q. La finalitat és la de neutralitzar la dissolució i disminuir al màxim la presència de sals abans de liofilitzar la proteïna. Un cop determinada la concentració de proteïna per absorbància a 280 nm, es liofilitza i es conserva d'aquesta forma a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins al moment de la seva utilització.

1.4. Expressió i purificació de l'enzim salvatge i el mutant C181A de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814

L'expressió dels enzims salvatge i el mutant C181A de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 s'ha realitzat en la soca BL21 d'*Escherichia coli*, a partir de l'ADN obtingut a l'Institut de Biologia Fonamental "Vicent Villar Palasí", de la Universitat Autònoma de Barcelona. En aquest cas s'ha fet servir el vector d'expressió pET, que s'ha desenvolupat per al clonatge i l'expressió de proteïnes recombinants a *Escherichia coli*, sota el control d'expressió de la polimerasa d'ARN del bacteriòfag T7.

Aquesta polimerasa només reconeix els seus promotors i és capaç de transcriure seqüències que la polimerasa d'ARN d'*Escherichia coli* no transcriu prou eficientment. El vector pET també conté diferents seqüències, adjacents als llocs de clonatge, que codifiquen per a diferents pèptids que faciliten la detecció i purificació de les proteïnes que les contenen. El gen de la β -glucosidasa es clona al costat d'una seqüència que codifica per a una cadena de 6 histidines consecutives, de manera que la proteïna s'expressa com una proteïna de fusió, amb la cua d'histidines a l'extrem N-terminal.

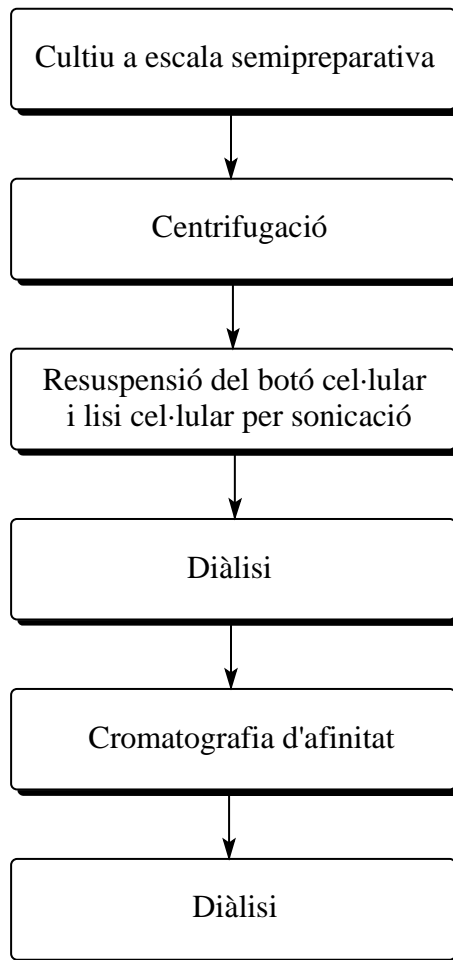


Figura 1.11. Esquema de les etapes de purificació de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814.

Les cèl·lules d'*Escherichia coli* transformades s'han cultivat en un matràs d'Erlenmeyer en un medi tamponat ric. Com la β -glucosidasa s'expressa a nivell intracel·lular la seva purificació implica la lisi del botó cel·lular, que es realitza amb ultrasons en presència d'un detergent no iònic per tal d'ajudar a solubilitzar parcialment la paret cel·lular. A continuació la fracció intracel·lular es purifica per cromatografia d'afinitat fent servir una reïna a la que s'han ancorat cations de níquel. S'aprofita l'elevada capacitat d'aquests cations per tal de formar complexes amb pèptids composts per residus d'histidina consecutius, amb l'objectiu de retenir la β -glucosidasa unida a la columna i separar-la de la resta de proteïnes i metabòlits del medi intracel·lular. Per a l'elució de la β -glucosidasa es fa servir imidazole, que competeix amb la proteïna per tal de quelar els

cations de níquel. Finalment, es concentra la dissolució de proteïna i es dialitza enfront de tampó fosfat sòdic pH 7. La puresa de les dues proteïnes avaluada per electroforesi d'acrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) ha estat superior al 90%. Generalment les proteïnes s'emmagatzemen liofilitzades a 4 °C, però en el cas de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 s'ha comprovat que la proteïna perd un tant per cent important de la seva activitat durant el procés de liofilització. Com a conseqüència la proteïna s'emmagatzema en tampó fosfat sòdic a pH 7 a 4 °C. En aquestes condicions la proteïna perd un 10% d'activitat cada 15 dies.

Comparant els mètodes de purificació de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* i de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 es fa palesa la millora que suposa el fet de poder purificar una proteïna per cromatografia d'afinitat, ja que en una única etapa cromatogràfica s'obté la proteïna d'interès amb elevada puresa. Això comporta la reducció del temps de purificació i de les etapes de manipulació de mostra, i a més, permet evitar etapes de purificació que potser no tenen lloc a les condicions més adequades per a l'estabilitat de la proteïna. Tot plegat juga a favor de l'estabilitat de la proteïna d'interès.

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

La caracterització cinètica de les glicosidases s'ha realitzat tradicionalment emprant substrats sintètics que incorporen un grup cromofòric, per la immediatesa que comporta l'anàlisi enzimàtica posterior. Els trets característics d'aquests substrats sintètics són satisfer els requeriments estructurals mínims necessaris perquè l'enzim els reconegui com a substrats, i que s'hidrolitzin per un únic enllaç, alliberant una aglicona cromofòrica (o fluorofòrica). Aquest tipus de substrat explota, d'una banda, les propietats espectrofotomètriques del grup que s'incorpora com aglicona, i de l'altra, l'especificitat d'unió de l'enzim en estudi, que defineix l'estructura de la part glicònica. Així, entre els substrats més emprats es troben els 4'-metilumbel·liferil glicòsids i els fenil glicòsids [231-236].

Per tal de realitzar les caracteritzacions cinètiques i les anàlisis de Hammett de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 i de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, en el present treball s'han sintetitzat dues famílies d'aril β -D-glicòsids que difereixen bàsicament en l'estructura de la seva part glicònica (figura 2.1). Les β -glucosidases són enzims *exo*- que actuen sobre polímers de glucosa i tenen el centre actiu en forma de butxaca, de manera que la part glicònica dels substrats sintètics emprats en la seva caracterització és una única unitat de glucopiranososa. En canvi, la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* és un enzim *endo*-, amb un centre actiu format per diversos subetis i amb uns requeriments estructurals molt concrets per a la hidròlisi del substrat [151, 152, 237], que defineix una part glicònica amb l'estructura bàsica [β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)]_n- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glcp. Donat que l'activitat enzimàtica de la β -glucanasa augmenta en augmentar la longitud de la banda glicònica del substrat fins a $n = 3$ [206], per a la seva caracterització cinètica s'ha decidit treballar amb glicòsids amb l'estructura bàsica G4G3G-X i G4G4G3G-X (en què X és la part aglicònica del substrat), aprofitant que el trisacàrid G4G3G i el tetrasacàrid G4G4G3G són els principals productes obtinguts en la hidròlisi enzimàtica del β -glucà d'ordi, que és un dels substrats naturals de la 1,3-1,4- β -glucanasa.

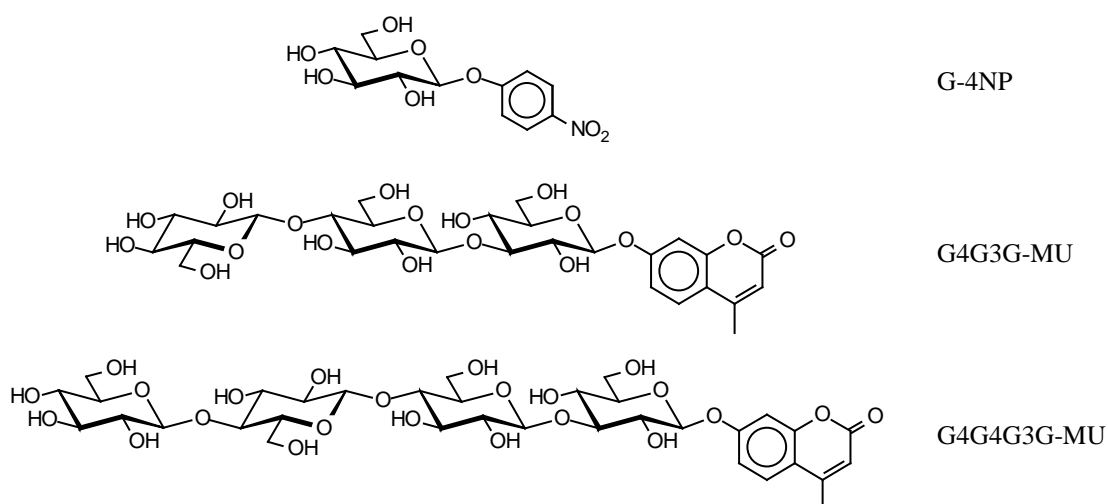


Figura 2.1. Estructures de tres dels substrats sintètics emprats en la caracterització cinètica de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp.QM-B814 (4'-nitrofenil β -D-glucopiranosid: G-4NP) i de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (4'-metilumbel·liferil O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosid: G4G3G-MU, i 4'-metilumbel·liferil O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosid: G4G4G3G-MU). Els dos substrats de la β -glucanasa només difereixen en la longitud de la part glicònica.

Per a l'anàlisi de les interaccions entre la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* i el grup hidroxil a C2 de la unitat de glucopiranososa que ocupa el subseti -1, s'ha sintetitzat el 2-desoxicompost G4G4G3(2dG)-4NP (figura 2.2), fent servir una estratègia sintètica diferent. En aquest glicòsid l'hidroxil a C2 de la unitat de glucopiranososa que sustenta l'enllaç a hidrolitzar està substituït per un àtom d'hidrogen, impeding la possible formació de les interaccions per pont d'hidrogen.

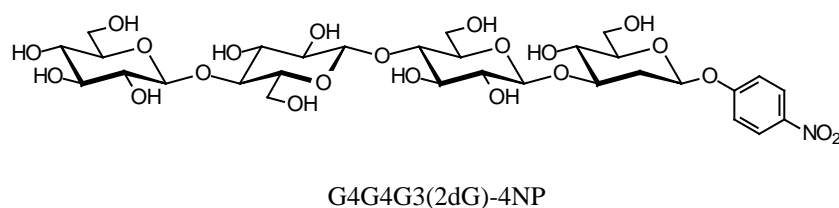


Figura 2.2. Estructura del compost 4'-nitrofenil O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-desoxi- β -D-glucopiranosid (G4G4G3(2dG)-4NP).

Finalment, per a l'avaluació de les cinètiques d'hidratació de glicals per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa, s'han estudiat diferents mètodes per a la síntesi de glicals 3- O -substituïts i s'han sintetitzat els glicals per- O -acetilats (G4G3G')_{Ac} i (G4G4G3G')_{Ac}. La des- O -acetilació del primer rendeix el glicàl que s'ha fet servir en les cinètiques, el G4G3G' (figura 2.3).

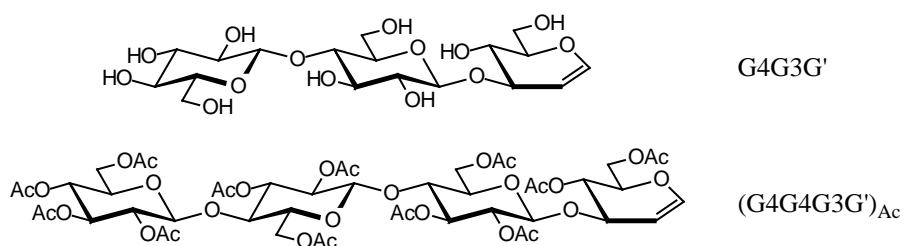


Figura 2.3. Estructura de dos dels glicals sintetitzats en el present treball: l'*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-1,5-anhidro-2-desoxi-D-*arabino*-hex-1-enitol: G4G3G', i l'*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- 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-*arabino*-hex-1-enitol: (G4G4G3G')_{Ac}.

2.2. Síntesi química d'enllaços glicosídics

La reacció principal en la química de carbohidrats és la formació d'un enllaç glicosídic. Aquesta condensació d'una unitat de carbohidrat, que actua com a donador, amb una altra molècula, que fa d'acceptor, és formalment una reacció de substitució nucleòfila. Els diferents mètodes sintètics, de manera anàloga a les reaccions de biosíntesi que es donen a la natura, introdueixen un grup funcional sobre el carboni anomèric del donador. Aquest grup, en les condicions d'activació adequades, es transforma en un bon grup sortint i en la reacció és substituït pel nucleòfil (figura 2.4).

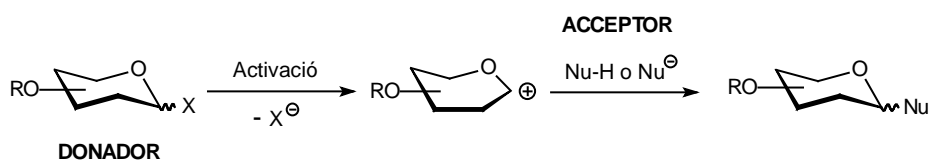


Figura 2.4. Mecanisme general de la reacció de glicosidació.

Des de principis del segle XX, en què es va descriure la primera reacció de glicosidació [238], el nombre de mètodes que introdueixen variacions en el grup sortint del donador o en les condicions de catalisi de la reacció no ha deixat de créixer (per a una revisió veure [239, 240]). Un altre aspecte a tenir en compte és que, a diferència del que passa a la natura, on la biosíntesi de glicòsids està catalitzada per enzims de forma regio- i estereoselectiva, en la síntesi química es fa necessari l'ús de grups protectors per tal de guiar la regio- i estereoespecificitat de la síntesi. Aquesta darrera ve governada essencialment per dos factors: l'assistència anquimèrica i l'efecte anomèric.

L'assistència anquimèrica ve donada per la presència d'un "grup assistent" en el carboni veí al centre anomèric, que generalment és un grup èster o un grup amida en el cas dels 2-amino-2-desoxisucres. Aquest grup actua després de l'alliberament del grup sortint, per atac al carboni anomèric per part d'un dels parells electrònics de l'oxigen carbonílic, formant un catió dioxoloni (figura 2.5). En aquesta estructura intermèdia queda

protegida la cara del pla sobre la que es troba el grup anquimèric (si és equatorial queda protegida la cara α , mentre que si és axial, queda protegida la cara β), direccionant l'atac del nucleòfil, que només pot donar-se per la cara oposada. El resultat és l'obtenció estereoespecífica d'un enllaç glicosídic amb configuració β per al grup anquimèric equatorial, i α per al grup anquimèric axial.

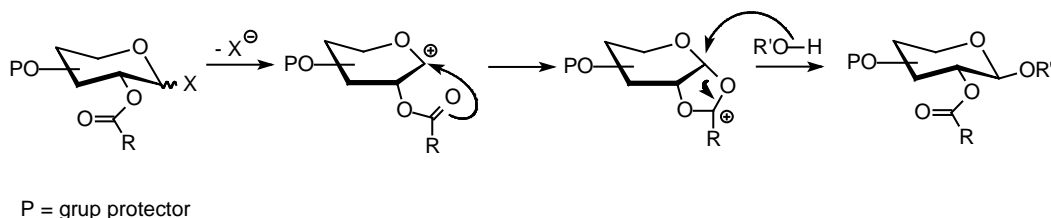


Figura 2.5. Mecanisme general d'assistència anquimèrica.

Per una altra banda, l'efecte anomèric és “la tendència d'un substituent electronegatiu a C1 d'un anell de piranosa a assumir preferentment l'orientació axial abans que l'equatorial, relativa als mateixos conformers en un anell ciclohexànic” [241]. Aquest efecte estereoelectrònic, observat per primer cop a mitjans de la dècada dels 1950 [242] és capaç de vèncer la preferència d'un substituent d'un anell de sis membres a adquirir la configuració equatorial per tal de minimitzar les interaccions 1,3- i 1,5-diaxials. El seu efecte es fa especialment palès en absència d'assistència anquimèrica, ja que com a productes de la reacció de glicosidació s'obtenen els dos anòmers amb una relació $\alpha:\beta$ superior a la unitat (figura 2.6).

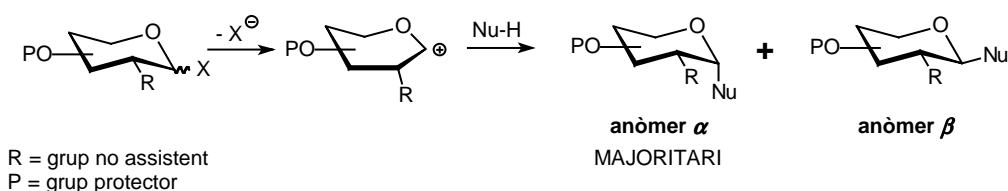


Figura 2.6. Mecanisme general d'una reacció de glicosidació en absència d'efecte anquimèric, amb l'obtenció majoritària de l'anòmer α en virtut de l'efecte anomèric.

L'efecte anomèric és el resultat de la combinació de dos efectes estereoelectrònics. El primer és la tendència a minimitzar el moment dipolar total de la molècula, que és la suma vectorial de tots els moments dipolars locals. Un substituent anomèric equatorial causa un moment dipolar local en la mateixa direcció i sentit que el creat pels parells electrònics lliures de l'oxigen endocíclic, mentre que un substituent axial el crea en la direcció oposada. Aquesta tendència és més acusada com més apolar és l'entorn de la molècula. L'altre efecte rau en el fet que la interacció entre els electrons no enllaçants de l'oxigen endocíclic i l'orbital antienllaçant σ^* de l'enllaç glicosídic es veu afavorida geomètricament quan el substituent anomèric té configuració axial.

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 *Bacillus licheniformis*

La síntesi dels substrats cromofòrics de la 1,3-1,4- β -glucanasa, tret de la del 2',4'-dinitrofenil trisacàrid **28**, s'ha basat en el mètode posat a punt anteriorment a l'equip [198, 200] per a la síntesi de 4'-metilumbel-liferil glicòsids, amb petites adaptacions. D'aquestes, la més significativa és el canvi de les condicions de l'etapa de des-*O*-acetilació per als substrats més inestables (pK_a de l'aglicona inferior a 6). A la figura 2.7 es mostra l'esquema general de síntesi d'aquests substrats.

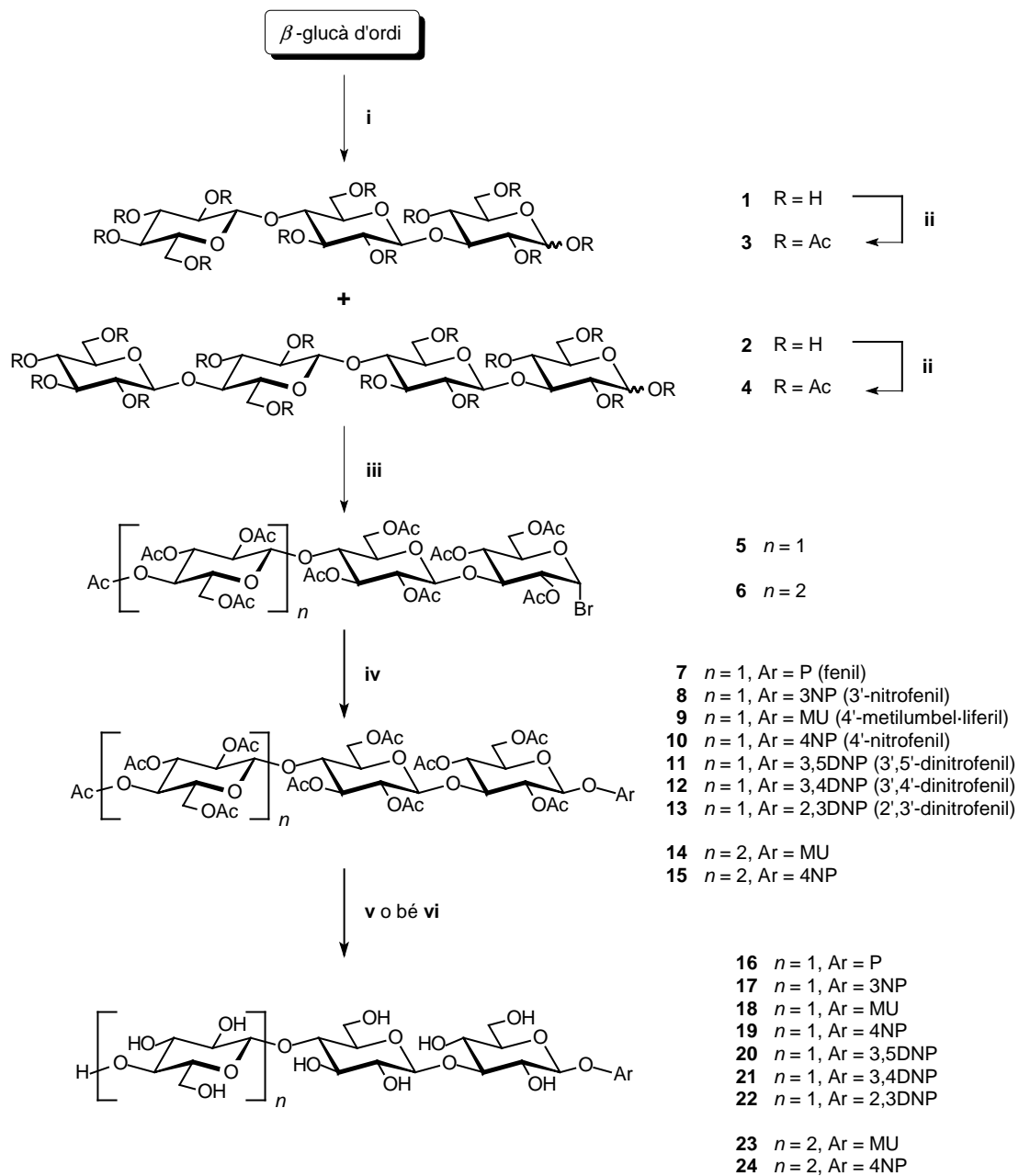


Figura 2.7. Síntesi dels substrats cromofòrics **16-24** de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. **i)** 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, 40 °C, 19 h; **ii)** Ac₂O/Py (1:1), t.a., 24 h, separació cromatogràfica (rendiment etapes **i+ii**: $n = 1$, 44% en pes referit al β -glucà,

$n=2$, 23% en pes referit al β -glucà); **iii**) HBr/HAcO 33%, t.a., 30 min (99%); **iv**) ArOH, BTEBA, NaOH 1.25 M, CHCl₃, reflux, 2-12 h ($n=1$, Ar=P, 22%; $n=1$, Ar=3NP, 57%; $n=1$, Ar=MU, 49%; $n=1$, Ar=4NP, 62%; $n=1$, Ar=3,5DNP, 51%; $n=1$, Ar=3,4DNP, 67%; $n=1$, Ar=2,3DNP, 31%; $n=2$, Ar=MU, 41%; $n=2$, Ar=4NP, 55%); **v**) NaOMe/MeOH 20 mM, t.a., 12 h ($n=1$, Ar=P, 45%; $n=1$, Ar=3NP, 26%; $n=1$, Ar=MU, 93%; $n=1$, Ar=4NP, 36%; $n=1$, Ar=3,5DNP, 66%; $n=2$, Ar=MU, 95%; $n=2$, Ar=4NP, 62%); **vi**) HCl 26% en MeOH (p/v), atm. Ar, 4 °C, 20-25 h ($n=1$, Ar=3,4DNP, 49%; $n=1$, Ar=2,3DNP, 23%).

2.3.1. Digestió de β -glucà d'ordi amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

A la primera etapa es fa servir un dels substrats naturals de l'enzim, el β -glucà d'ordi, com a producte de partida, aprofitant l'especificitat per substrat de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, que genera el trisacàrid **1** i el tetrasacàrid **2** (figura 2.8) com a productes majoritaris d'hidròlisi [156]. Com es tracta d'una digestió llarga, 19 hores, la reacció s'ha dut a terme a 40 °C, que és una temperatura de compromís entre el màxim d'activitat de l'enzim, de 55 °C [169], i la seva estabilitat tèrmica. Cal a més, una segona addició d'enzim cap a les 12 hores de reacció. El cru de reacció obtingut s'ha destil·lat a pressió reduïda i el residu s'ha assecat exhaustivament al buit per tal d'eliminar al màxim la presència d'aigua.

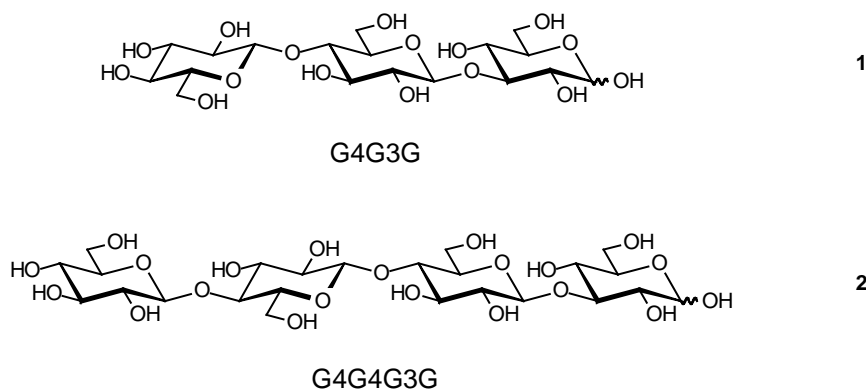


Figura 2.8. Productes majoritaris de la hidròlisi del β -glucà d'ordi, substrat natural, per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

2.3.2. Acetilació del cru d'hidròlisi

El cru d'hidròlisi s'ha acetilat directament amb una mescla d'Ac₂O/Py (1:1) a temperatura ambient. Aquest mètode d'acetilació, descrit per Verley i Bosling [243] i aplicat a la química de carbohidrats per Fischer i Bergmann [244], forma part de la metodologia més habitual per tal de protegir un grup hidroxil en forma d'èster, fent servir un anhídrid o clorur d'àcid en presència d'una base, sovint la piridina, que actua alhora de dissolvent. La separació cromatogràfica posterior del cru de reacció resultant ha rendit el tri- i tetrasacàrid per-*O*-acetilats **3** i **4** amb un rendiment del 44% i 23% en pes referit al β -glucà, respectivament. Els compostos **3** i **4** aïllats es digereixen per separat en èter diisopropílic abans de les següents etapes de reacció.

2.3.3. Síntesi dels bromurs de glicosil

La manera més usual d'obtenir els bromurs de glicosil acetilats és per tractament del glicòsid per-*O*-acetilat en una dissolució al 33% de HBr en AcOH [245]. Així, l'obtenció dels bromurs d' α -glicosil **5** i **6** s'ha realitzat de forma quantitativa per tractament dels glicòsids per-*O*-acetilats **3** i **4** respectivament amb HBr/AcOH al 33% sota atmosfera de nitrogen i a temperatura ambient. La reacció es dona per acabada quan s'observa la dissolució completa del producte de partida, i cal aturar-la immediatament per tal de minimitzar la solvòlisi del producte d'interès. Donada la labilitat del bromur, aquesta reacció s'efectua just abans de la reacció de glicosidació, sense emmagatzemament del producte de reacció.

2.3.4. Glicosidació dels bromurs de glicosil

La reacció de glicosidació transcorre amb inversió de configuració, obtenint els aril β -glicòsids d'interès mitjançant una reacció amb el fenol corresponent amb catàlisi per transferència de fase. Seguint el mètode descrit per Dess *et al.* [246], la reacció té lloc en un sistema heterogeni NaOH(aq.)/CHCl₃ a la temperatura d'ebullició de la barreja, i es fa servir el bromur de benziltriethylamoni (BTEBA) com a catalitzador de transferència de fase. El BTEBA transporta el fenòxid de la fase aquosa a la fase orgànica on, en trobar-se desolvatat, té un major poder nucleòfil.

El rendiment de la glicosidació obtingut per als diferents fenols se situa en un marge que va des d'un 22% per al fenol fins a un 67% en el cas del 3,4-dinitrofenol. Els subproductes principals d'aquesta reacció són el producte de β -eliminació **25**, i el producte d'hidròlisi **26** (figura 2.9).

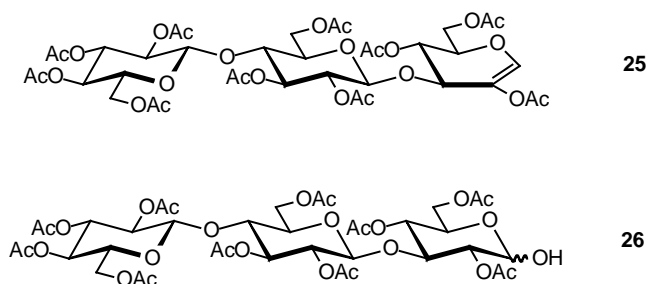


Figura 2.9. Estructura dels dos principals subproductes de la reacció de glicosidació, el producte de β -eliminació **25** i el producte d'hidròlisi **26**.

2.3.5. Desprotecció dels glicòsids acetilats

La des-*O*-acetilació dels glicòsids **7-11** i **14** i **15**, per als que el pK_a de l'aglicona és superior a 6, s'ha realitzat per transesterificació en metanol anhidre emprant quantitats catalítiques de metòxid sòdic (transesterificació de Zemplén) [247, 248]. En aquells casos en què ha estat necessari, el sòlid obtingut s'ha purificat cromatogràficament i, en

tots els casos, el producte final s'ha recristal·litzat abans de fer-lo servir per a la caracterització cinètica dels enzims. Els rendiments obtinguts varien per als diferents glicòsids des d'un 26% per al G4G3G-3NP (**17**) fins a un 93% per al G4G4G3G-MU (**23**).

Els 3',4'-dinitrofenil i 2',3'-dinitrofenil glicòsids, **12** (pK_a de l'aglicona 5.36) i **13** (pK_a de l'aglicona 4.96) respectivament, que són més làbils a les condicions bàsiques emprades en la transesterificació de Zemplen, s'han des-*O*-acetilat per tractament amb una solució diluïda de clorur d'hidrogen en metanol [249]. La reacció s'ha realitzat sota atmosfera d'argó, a 4 °C i protegida de la llum per tal de minimitzar la hidròlisi del producte de reacció. Els rendiments obtinguts han estat d'un 23% per al 2',3'-dinitrofenil trisacàrid **22** i d'un 49% per al 3',4'-dinitrofenil glicòsid **21**. En aquest darrer cas el control del curs de reacció s'ha realitzat per HPLC amb detector d'UV-visible, a una longitud d'ona de 280 nm, ja que per c.c.f. s'observa la coelució de productes que dificulta el control de la reacció.

2.3.6. Síntesi del 2',4'-dinitrofenil *O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosid (**28**)

La síntesi del G4G3G-2,4DNP (**28**) no s'ha realitzat seguint el procediment descrit per a la resta de substrats, ja que en aquest cas l'aglicona, de pK_a 3.96, és un molt bon grup sortint, i el substrat resulta ser massa làbil a les condicions de reacció bàsiques emprades en la reacció de glicosidació per transferència de fase. A la bibliografia es presenten diverses opcions per tal de realitzar la síntesi de 2',4'-dinitrofenil glicòsids basades en la substitució nucleòfila aromàtica de l'1-fluoro-2,4-dinitrobenzè per part de l'hidroxil anomèric del glicòsid, proposada per primera vegada per Koeners [250]. Les dues estratègies principals parteixen, l'una, del glicòsid totalment desprotegit aprofitant la major basicitat de l'hidroxil anomèric sobre la resta d'hidroxils, per tal d'obtenir el producte desitjat en una única etapa sintètica [251]; i l'altra parteix del glicòsid per-*O*-acetilat, que es desprotegeix selectivament a l'hidroxil anomèric, i arriba al producte d'interès després de tres etapes sintètiques [38]. La primera via ja havia estat explorada i descartada per a la síntesi del 2',4'-dinitrofenil trisacàrid **28** per altres membres del grup anteriorment al present treball, de manera que es fa servir la segona via, que presenta l'esquema de síntesi que es mostra a la figura 2.10.

La desprotecció selectiva de l'hidroxil anomèric del trisacàrid per-*O*-acetilat **3** es realitza amb acetat d'hidrazina en DMF a 55 °C [252], i s'obté el trisacàrid **26** amb un rendiment del 97%. A continuació la substitució nucleòfila aromàtica de l'1-fluoro-2,4-dinitrobenzè per part de l'hidroxil lliure del glicòsid **26** es realitza en DMF anhidra emprant com a catalitzador 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octà (DABCO) [250] sota atmosfera inerta i en presència de tamisos moleculars. S'obté el 2',4'-dinitrofenil trisacàrid per-*O*-acetilat **27** amb un rendiment del 50% després de purificació cromatogràfica. Finalment, el 2',4'-dinitrofenil trisacàrid d'interès **28** s'ha obtingut per des-*O*-acetilació del glicòsid **27** en una solució diluïda de clorur d'hidrogen en metanol [249] sota atmosfera d'argó, a 4 °C i protegida de la llum. El compost **28** s'ha obtingut amb un rendiment del 33% després de recristal·lització.

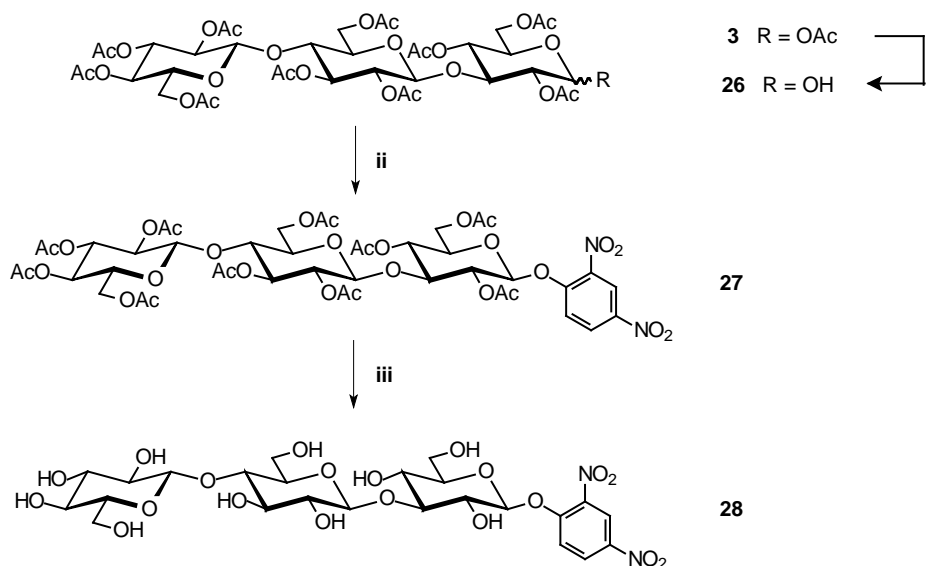


Figura 2.10. Síntesi del G4G3G-2,4DNP a partir de trisacàrid per-*O*-acetilat **3**. **i)** Acetat d'hidrazina, DMF, 50 °C, 8 min (97%); **ii)** 1-fluoro-2,4-dinitrobenzè, DABCO, DMF, atm. Ar, 4 Å MS, 18 h, 30°C (50%); **iii)** HCl 26% en MeOH (p/v), atm. Ar, 4 °C, 18 h (33%).

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 *Streptomyces* sp. QM-B814

L'obtenció dels substrats emprats per a la caracterització cinètica de la β -glucosidasa ha estat més senzilla, ja que alguns dels substrats són comercials. Per a la síntesi de la resta, tret del 2',4'-dinitrofenil glucòsid, s'ha seguit el mateix esquema sintètic emprat en la síntesi dels aril glicòsids substrats de la 1,3-1,4- β -glucanasa (figura 2.11).

Per a la síntesi del 2',4'-dinitrofenil glucòsid (**41**) s'ha fet servir una estratègia de glicosidació diferent, pels mateixos problemes de labilitat exposats en la síntesi del 2',4'-dinitrofenil trisacàrid **28**. Tot i així, en aquest cas s'ha optat per la via que parteix del glicòsid totalment desprotegit i aprofita la major basicitat de l'hidroxil anomèric sobre la resta d'hidroxils, ja que és la via més simple i permet obtenir el producte desitjat **41** en una única etapa sintètica [251].

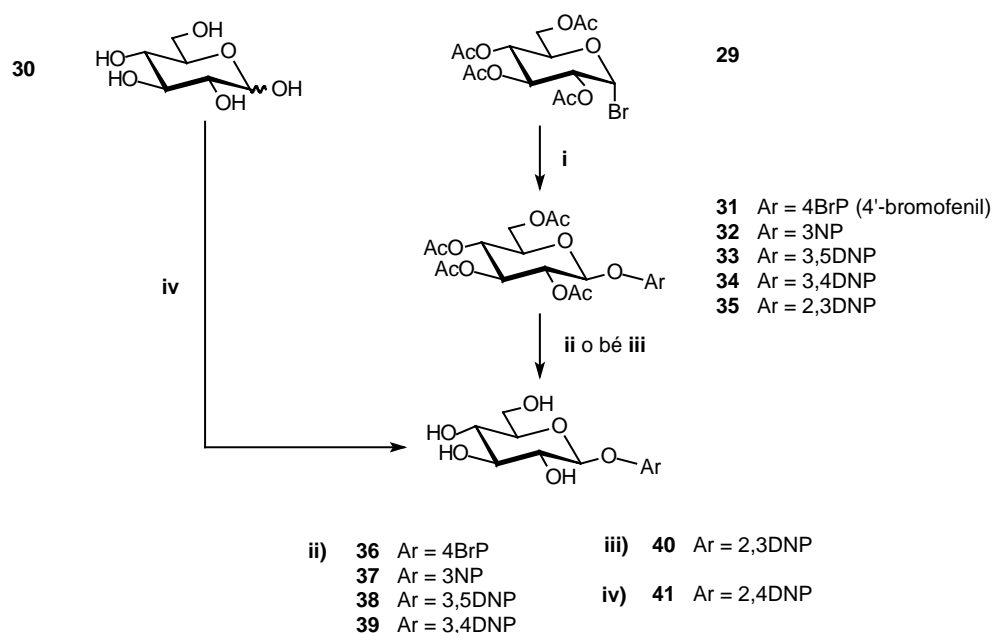


Figura 2.11. Síntesi de diferents substrats de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814. **i)** ArOH (excepte 2,4-dinitrofenol), BTEBA, NaOH 1.25 M, CHCl_3 o CH_2Cl_2 , reflux, 3.5-10 h (Ar=4BrP, 30%; Ar=3NP, 22%; Ar=3,5DNP, 38%; Ar=3,4DNP, 48%; Ar=2,3DNP, 50%); **ii)** NaOMe/MeOH 20 mM, t.a., 2-9 h (Ar=4BrP, 12%; Ar=3NP, 41%; Ar=3,5DNP, 68%; Ar=3,4DNP, 55%); **iii)** HCl en MeOH (26% p/v), atm. Ar, 4 °C, 7 h (Ar=2,3DNP, 40%); **iv)** 1-fluoro-2,4-dinitrobenzè, etanol/ NaHCO_3 (aq.), t.a., 12 h (9%).

2.4.1. Síntesi dels aril β -D-glucopirànòsids 36-40

Els aril glucòsids acetilats s'han sintetitzat partint del bromur de glucosil acetilat (**29**), fent servir el procediment de transferència de fase amb BTEBA descrit per Dess [246]. Els productes de reacció s'han purificat per cromatografia *flash*, excepte en el cas del 3',4'-dinitrofenil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopirànòsid (**34**), en què n'hi ha hagut prou amb una recristal·lització. El rendiment de la reacció ha variat des del 22% per al 3'-nitrofenil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopirànòsid (**32**) fins al 50% per al 2',3'-dinitrofenil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopirànòsid (**35**).

Els 4'-bromofenil, 3'-nitrofenil, 3',5'-dinitrofenil i 3',4'-dinitrofenil glucòsids acetilats (**31-34**) s'han desprotegit emprant la transesterificació de Zemplen i, en el cas del darrer, i de forma similar a la desprotecció del trisacàrid **12**, seguint el curs de la reacció per HPLC. La purificació del 3',4'-dinitrofenil β -D-glucopirànòsid (**39**) ha precisat d'una cromatografia de polsos a mitja pressió i posterior cristal·lització, mentre que la resta de glucòsids s'han purificat en una etapa de cristal·lització. Els rendiments de desprotecció obtinguts es troben entre l'11% per al 4'-bromonitrofenil β -D-glucopirànòsid i el 69% per al 3',5'-dinitrofenil β -D-glucopirànòsid. El 2',3'-dinitrofenil β -D-glucopirànòsid acetilat **35** s'ha des-*O*-acetilat en clorur d'hidrogen en metanol sota atmosfera d'argó a 4 °C i protegit de la llum. El curs de la reacció s'ha seguit per HPLC, i s'ha aturat en observar l'alliberament de 2,3-dinitrofenol. El producte **40** s'ha purificat per cromatografia de polsos a mitja pressió a 4 °C, obtenint-se un rendiment del 40%.

2.4.2. Síntesi del 2',4'-dinitrofenil β -D-glucopiranosid (41)

S'ha fet reaccionar la glucosa amb bicarbonat sòdic i 1-fluoro-2,4-dinitrobenzè emprant una mescla aigua/etanol com a dissolvent. El producte **41** es purifica per cromatografia flash seguida de recristal·lització, obtenint un rendiment del 9%.

2.5. Síntesi de l'*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-1,5-anhidro-2-desoxi-D-arabino-hex-1-enitol (56)

L'obtenció del glical **56** ha centralitzat una gran part dels esforços sintètics de la present tesi. En anteriors treballs al grup ja s'havia vist que el glical G4G3G' (**56**), més que actuar com a inhibidor de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, es comporta com a pseudosubstrat, hidratant-se al 2-desoxiglicòsid corresponent. L'estudi de la cinètica de la hidratació enzimàtica, junt amb l'estudi del possible paper del glical **56** com a donador glicosídic en les reaccions en què la 1,3-1,4- β -glucanasa actua com a glicosintasa (activitat estudiada en altres treballs per altres membres del grup), motiven l'obtenció d'aquest compost a gran escala. De les tres etapes principals que conformen l'esquema sintètic d'aquest compost (obtenció del precursor, síntesi del glical trisacàrid per-*O*-acetilat **42**, i des-*O*-acetilació per tal d'obtenir el compost d'interès **56**) l'etapa central és la més conflictiva. Gràcies a la gran versatilitat dels glicals, que ha permès fer-los servir àmpliament com a donadors en la síntesi de molts derivats sacarídics [253], s'han desenvolupat nombrosos mètodes per a la seva síntesi [254-266]. D'entre tots ells, destaquen els que es basen en la reducció del corresponent bromur de glicosil. A continuació es descriuen els mètodes que s'han assajat en la present tesi amb l'objectiu d'estudiar la síntesi de glical acetilat **42**.

2.5.1. Obtenció del glical *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-arabino-hex-1-enitol (42)

Per a la síntesi del glical **42** s'han assajat diferents metodologies que exploren dues vies retrosintètiques diferents (figura 2.12). En una d'elles es parteix de l'estructura del glugal, i després d'una sèrie d'etapes de desprotecció i activació, s'arriba a obtenir l'oligosacàrid **42** a través d'una reacció de glicosidació. En aquest cas concret, la cel·lobiosa convenientment protegida i activada actua de donador, i un glugal protegit en els hidroxils 4 i 6 actua d'acceptor. La segona metodologia es basa en la síntesi del glical directament des del trisacàrid amb l'estructura desitjada, Glcp β 1,4Glcp β 1,3Glcp, convenientment protegit i activat.

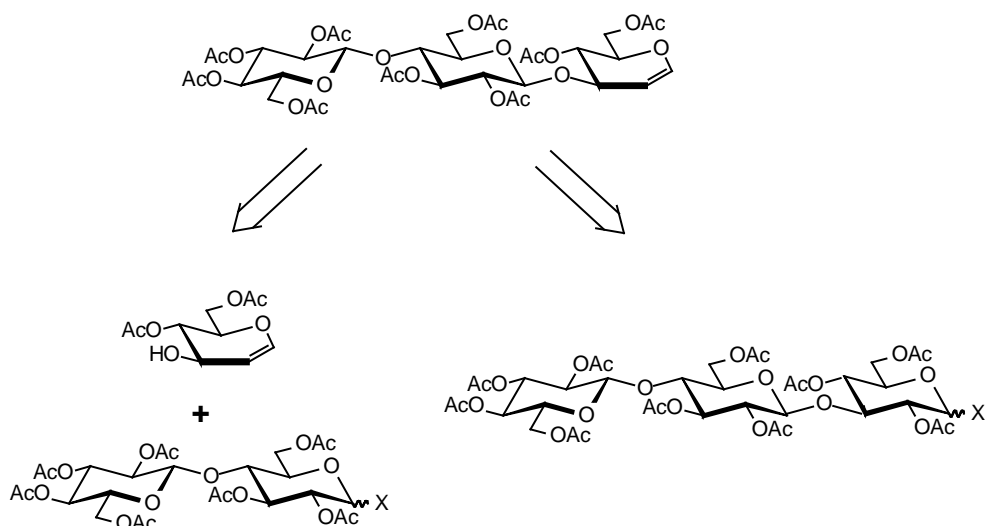


Figura 2.12. Diferents estratègies per a la síntesi del glicol ($(G4G3G')_{Ac}$).

Aquesta segona via ja havia estat estudiada al grup amb anterioritat al present treball, amb la reducció del bromur del trisacàrid acetilat **5** emprant quatre mètodes diferents: Primer, la modificació de Helferich [267] (utilització d'un medi de reacció neutre) del mètode original de Fischer i Zach [254], en què la reducció es realitza amb Zn en àcid acètic (figura 2.13 a dalt); segon, el mètode de Pollon [260], que fa servir crom(II) en medi bàsic (figura 2.13 a baix); tercer, el mètode de Csuk [259], que fa servir un complex de Zn/plata/grafit en THF; i finalment el mètode de Somsák [265], en què es redueix el bromur de glicosil amb Zn en pols en un dissolvent apròtic i amb catàlisi bàsica. D'aquests quatre mètodes només amb els dos primers s'obté el glicol d'interès **42** amb un rendiment quantificable, del 17% amb el mètode de Helferich, i del 9% amb el de Pollon (Meritxell Sigalés, comunicació personal).

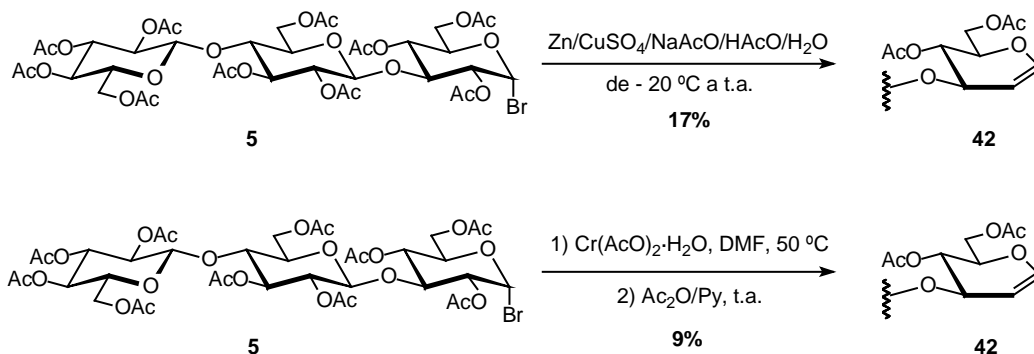


Figura 2.13. A dalt: Síntesi del glicol **42** fent servir la modificació de Helferich del mètode de Fischer i Zach. A baix: Síntesi del glicol **42** fent servir el mètode de Pollon *et al.*

Sembla doncs, que si bé els diferents mètodes descrits amb la finalitat de dur a terme la reducció del bromur de glicosil donen rendiments acceptables per a l'obtenció del glicol i/o del cel-lobial, no estan exempts de problemes quan el glicol que s'intenta obtenir presenta l'estructura $[Glc\beta 1,4]_nGlc\beta 1,3Glc$, on $n = 0, 1, 2, \dots$. El fet que la posició

al·lílica del doble enllaç del glical estigui substituïda amb una unitat de glucopiranososa, fa que en les condicions àcides que solen emprar-se en la síntesi de glicals es produeixin molts reordenaments i reaccions secundàries no desitjades [254]. Amb aquests antecedents s'ha abordat la síntesi del glical **42** des de tres fronts diferents. El primer suposa estudiar la primera estratègia sintètica, que implica la glicosidació del glical; el segon comporta l'estudi de les variables que afecten la reacció de Helferich, que és el mètode amb el que s'havia aconseguit la síntesi del glical d'interès amb més eficiència amb anterioritat a aquest treball, amb la finalitat de millorar el rendiment obtingut; i el tercer implica l'exploració d'altres mètodes de reducció del bromur de glicosil.

2.5.1.1. Obtenció del glical d'interès (**42**) per glicosidació entre un glical i un donador oligosacàridic

Aquesta alternativa sintètica d'entrada sembla la més laboriosa, ja que s'han de preparar tant el donador com l'acceptor de glicosidació, però tots dos poden obtenir-se fàcilment a partir de productes comercials, a través de reaccions estudiades abastament i que no presenten gaires complicacions. Com a acceptor glicosídic s'ha fet servir el glical acetilat en els hidroxils a 4 i 6 (**44**), que s'ha obtingut per acció de la lipasa PS d'Amano sobre el glical per-*O*-acetilat (**43**) en medi aquós tamponat a pH 7.0 [268] (figura 2.14). El producte **44** s'ha obtingut amb un rendiment del 86% i s'ha identificat pel senyal assignable a l'hidroxil lliure en la posició 3 a l'espectre COSY.

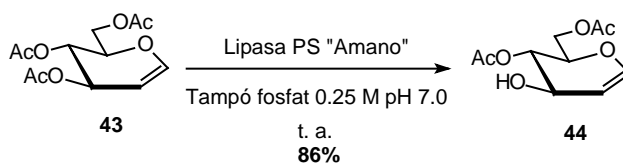


Figura 2.14. Des-*O*-acetilació selectiva de l'hidroxil 3 del glical **43** fent servir la lipasa PS de la casa comercial Amano.

Com a donador glicosídic es pot fer servir el bromur de cel·lobiosil per-*O*-acetilat (**46**), en cas d'aplicar una glicosidació seguint el mètode de Königs-Knorr [238], o el tricloroacetimidat de cel·lobiosil per-*O*-acetilat (**48**), si s'aplica el mètode de Schmidt. Aquests són dos dels mètodes de glicosidació més emprats. En el primer es fan servir halurs de glicosil com a donadors glicosídics (d'entre ells els bromurs són els que presenten el millor balanç entre estabilitat i reactivitat [245]) i l'activació es produeix afegint com a catalitzador, sals d'argent [238, 269] o de mercuri [270]. Aquestes sals actuen com halòfors, provocant la sortida del bromur i augmentant d'aquesta manera l'electrofilia del donador. En el mètode de Schmidt [271], la reacció s'activa fent servir com a catalitzador un àcid de Lewis, que protona el tricloroacetimidat accelerant d'aquesta manera la seva sortida en forma de tricloroacetamida.

Els dos donadors glicosídics s'han preparat partint de la cel·lobiosa per-*O*-acetilada (**45**). El bromur de cel·lobiosil **46** s'ha obtingut per tractament del compost comercial en una dissolució de HBr en HAcO al 33% a temperatura ambient, amb un rendiment del 98% (figura 2.15).

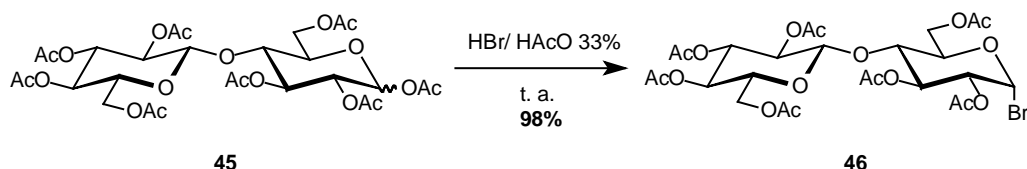


Figura 2.15. Síntesi del bromur **46** a partir del per-*O*-acetat de cel·lobiosa (**45**). HBr/HAcO 33%, t.a., 30 min.

L'obtenció del tricloroacetimidat s'ha realitzat en un procés en dues etapes (figura 2.16). A la primera s'ha desprotegit l'extrem reductor per reacció del per-*O*-acetat de cel·lobiosa amb acetat d'hidrazina en DMF a 55 °C [252], obtenint l'hemiacetal **47** amb un rendiment del 79% després de recristal·lització. A la segona etapa s'ha fet reaccionar l'hemiacetal **47** amb tricloroacetimidat en diclorometà a temperatura ambient, fent servir com a base carbonat de cesi. El donador **48** s'ha purificat per cromatografia i s'ha obtingut amb un rendiment del 85%.

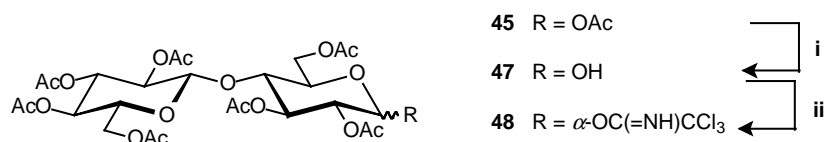


Figura 2.16. Síntesi del tricloroacetimidat **48** a partir del per-*O*-acetat de cel·lobiosa (**45**). i) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HAcO}$, DMF, 55 °C, 30 min (79%); ii) Cl_3CCN , Cs_2CO_3 , CH_2Cl_2 , t.a., 90 min (85%).

En un primer intent de glicosidació s'ha emprat el tricloroacetimidat **48** com a donador i el glucal **44** com a acceptor en diclorometà a -20 °C, i fent servir triflat de trimetilsilil (TMSOTf) com a catalitzador. El compost de glicosidació obtingut no ha estat el glicid d'interès **42**, sinó el producte de transposició **49** (figura 2.17), com s'ha comprovat mitjançant els espectres COSY i HETCOR.

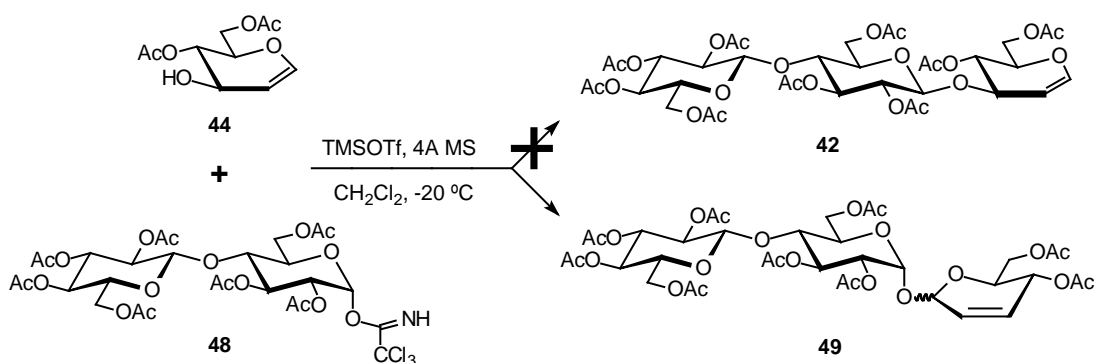


Figura 2.17. Productes obtinguts en la reacció de glicosidació fent servir com a acceptor el glucal **44** i com a donador el tricloroacetimidat **48**.

El compost **49** s'ha format com a conseqüència de la transposició de Ferrier [272] (figura 2.18), que és una transposició al·lílica catalitzada per l'àcid de Lewis emprat en la reacció de glicosidació. La formació del glicòsid **49** es podria produir a través de dues

vies. Per una banda, mitjançant la transposició del doble enllaç en el glucal **44** i la posterior addició d'una unitat del donador hidrolitzada sobre l'intermedi catiònic. De fet, la mateixa transposició del glucal **44** podria aportar l'aigua causant de la hidròlisi del donador. Per una altra banda, per transposició del glical trisacàrid **42**.

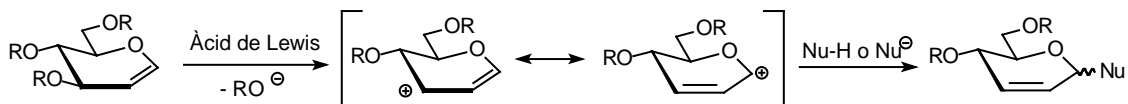


Figura 2.18. Mecanisme general de la transposició de Ferrier.

En un intent de minimitzar aquesta reacció indesitjada s'ha dut a terme la glicosidació a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, obtenint el glical d'interès **42** amb un 15% de rendiment (figura 2.19). El producte majoritari obtingut en aquest cas, amb un 43%, és el compost **50**, producte de transposició i autocondensació del glucal. Aquest és el producte majoritari obtingut també en altres reaccions de glicosidació en què s'ha canviat el catalitzador de la reacció, emprant $\text{BF}_3\cdot\text{EtOEt}$, i en d'altres en què s'ha emprat el mètode de Königs-Knorr (en aquest darrer cas s'ha eliminat el medi àcid causant de la transposició), sense que s'observi millora en el rendiment de síntesi del glical **42**.

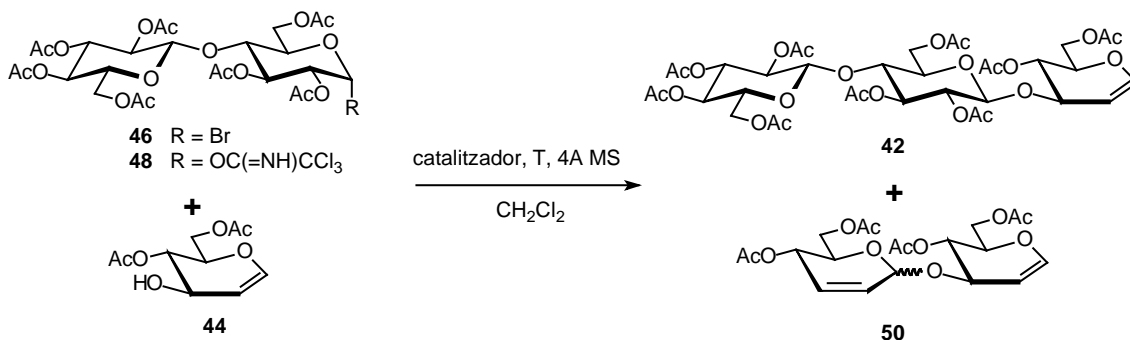


Figura 2.19. Productes obtinguts en les reaccions de glicosidació emprant el mètode de Schmidt a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, fent servir com a catalitzador (a) triflat de trimetilsilil (rendiment del 15%) o (b) trifluorur de bor eterat, i (c) emprant el mètode de Königs-Knorr a t.a. i amb $\text{HgBr}_2/\text{Hg}(\text{CN})_2$ com a catalitzador.

Donat els baixos rendiments obtinguts en aquests assaigs, es va decidir abandonar la via sintètica d'obtenció de glicals emprant la glicosidació del glucal amb altres unitats oligosacàridiques, i el treball es va centrar novament en l'obtenció del producte d'interès mitjançant la reducció del bromur de glicosil corresponent.

2.5.1.2. *Estudi de les variables per a l'obtenció del glical d'interès emprant el mètode de Helferich*

En el moment d'iniciar la present tesi, la variant de Helferich de la reacció de Fischer i Zach era el mètode que havia ofert millors resultats per a la síntesi del glical amb estructura $\text{Glc}\beta\text{1,4Glc}\beta\text{1,3Glc}$. Per tant, es va decidir avaluar la influència de les

condicions experimentals en el rendiment de la reacció, per tal de millorar-lo. Per tal de determinar els factors influents s'ha aplicat un disseny experimental [273], que consta de tres etapes: la identificació dels factors que poden afectar en el resultat, el disseny de l'experiment de forma que es minimitzin els efectes dels factors no controlats, i l'anàlisi estadística per tal de determinar els efectes causats pels diferents factors.

La metòdica objecte d'estudi és la següent: sobre una suspensió de Zn en pols en una dissolució de sulfat de Cu(II) i d'acetat sòdic en àcid acètic aquós a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, s'afegeix lentament, el bromur de glicosil acetilat dissolt en una solució aquosa d'àcid acètic. Un cop finalitzada l'addició es deixa evolucionar la reacció a temperatura ambient. Per tal d'augmentar la reactivitat del Zn, es realitza una activació prèvia a la reacció per rentats successius del Zn amb HCl, aigua destil·lada, (solució de CuSO_4 opcional), acetona i èter etílic. Acabada la reacció es filtra el cru sobre Celite, que es renta amb una dissolució aquosa d'àcid acètic, i els filtrats s'extreuen amb cloroform.

Els paràmetres que s'han triat per tal de determinar-ne la influència en el rendiment de la reacció són la concentració de Zn, la concentració de Cu(II), la temperatura de reacció i l'activació del Zn amb Cu(II) prèvia a la reacció. Per a cada variable s'han definit dos nivells: per a les concentracions de Zn i Cu(II) els dos nivells són la concentració indicada a la metòdica i el doble de la mateixa; en el cas de la temperatura s'ha escollit temperatura ambient i $0\text{ }^{\circ}\text{C}$; i per tal d'avaluar l'efecte de l'activació del Zn amb Cu(II), els dos nivells són amb o sense activació prèvia. Amb la finalitat d'avaluar la influència d'aquests factors i les seves possibles interaccions s'ha realitzat un disseny factorial complet (2^4 FC), que en aquest cas, comporta realitzar 16 experiències. Aquestes 16 experiències sumades a les que s'han de realitzar posteriorment per tal d'optimitzar les condicions, fan econòmicament poc viable l'aplicació d'aquest procediment al bromur del trisacàrid G4G3G acetilat (**5**). S'ha decidit, per tant, realitzar totes les etapes d'optimització sobre el bromur de cel·lobiosa per-*O*-acetilada (**46**), que és un producte molt més senzill d'obtenir i força més assequible des del punt de vista econòmic (figura 2.20).

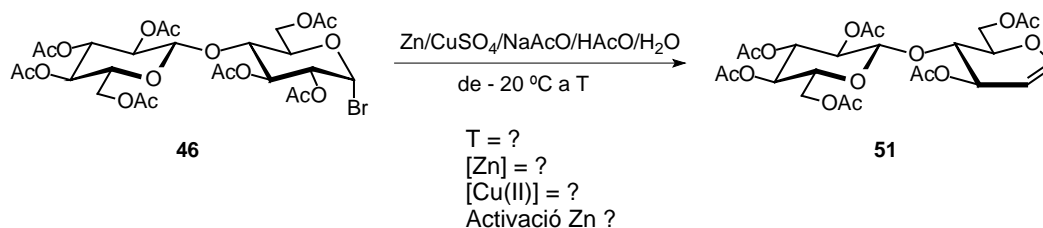


Figura 2.20. Reacció de Helferich per a la síntesi del cel·lobial per-*O*-acetilat (**51**) partint del bromur de cel·lobiosa per-*O*-acetilada (**46**). S'indiquen els quatre paràmetres objecte d'estudi.

Tot i que fóra ideal partir del bromur **46**, la seva baixa estabilitat i el fet que la seva síntesi sigui quantitativa fan recomanable partir de la cel·lobiosa per-*O*-acetilada, i que la síntesi del bromur corresponent sigui l'etapa inicial de cada experiment. El rendiment dels diferents experiments s'ha avaluat sobre el cru de reacció en base al percentatge de cel·lobial **51** present a la mescla, determinat a partir dels senyals de ^1H -RMN fent servir DMSO com a patró. El disseny d'experiències del model factorial complet, així com el rendiment de la reacció obtingut en cada cas es mostren a la taula 2.1.

Taula 2.1. Disseny d'experiències per tal d'avaluar l'efecte de la concentració de Zn, de la concentració de Cu(II), de la temperatura i de l'activació prèvia del Zn amb CuSO₄ en el rendiment de la síntesi del cel·lobial per-*O*-acetilat, prenent com a referència el mètode de Helferich. En les columnes corresponents s'indica el nivell de cada variable emprat en l'experiment en concret, on 1X i 2X corresponen a la concentració indicada a la metòdica i al doble de la mateixa, respectivament. A la darrera columna es presenta el rendiment obtingut en cada experiment.

Experiment	[Zn]	[Cu(II)]	Activació del Zn	T. reacció	Rendiment / %
C1	1X	1X	No	t.a.	26.5
C2	2X	1X	No	t.a.	53.6
C3	1X	2X	No	t.a.	42.4
C4	1X	1X	Sí	t.a.	54.8
C5	2X	1X	Sí	t.a.	61.0
C6	1X	2X	Sí	t.a.	48.3
C7	2X	2X	No	t.a.	52.9
C8	2X	2X	Sí	t.a.	59.3
C9	1X	1X	No	0 °C	18.5
C10	2X	2X	Sí	0 °C	38.6
C11	2X	1X	Sí	0 °C	44.0
C12	1X	2X	No	0 °C	13.4
C13	2X	1X	No	0 °C	14.6
C14	2X	2X	No	0 °C	33.4
C15	1X	1X	Sí	0 °C	30.5
C16	1X	2X	Sí	0 °C	38.3

A partir d'aquests resultats i descartant les interaccions de tercer i quart ordre s'arriba a la conclusió que la temperatura en primer terme, el rentat inicial amb coure per tal d'activar el Zn en segon terme, i la concentració de Zn en tercer terme, influeixen positivament en el rendiment de la reducció. S'observa que la concentració de Cu(II) en el medi de reacció no afecta el rendiment, i que la influència de les interaccions entre paràmetres no és significativa. L'optimització de la metòdica s'ha realitzat, doncs, efectuant variacions sobre la temperatura de reacció i la concentració de Zn, mantenint la mateixa concentració de Cu(II) que s'indica a la metòdica original. S'ha decidit incloure l'etapa d'activació prèvia del Zn amb Cu(II) com un pas més de la metòdica, ja que el seu efecte sobre el rendiment és positiu.

Donat que els dos factors a estudiar es valoren dins d'un marge limitat (l'agitació de la reacció es fa molt difícil a una concentració de Zn 5 vegades superior a la indicada a la metòdica; i la temperatura màxima probablement se situa a prop de temperatura ambient, que és la indicada a la metòdica original) es decideix fer servir un disseny de tipus uniforme, com ara el mètode de Doehlert [274], aplicat de forma seqüencial. En un disseny uniforme es realitzen diversos experiments simultanis de forma sistemàtica que permeten construir una superfície de resposta. En el disseny de Doehlert la distribució dels punts experimentals es localitza a la superfície d'una hiperesfera, i el nombre d'experiments ve donat per l'expressió $n^2 + n + 1$, on "n" és el nombre de factors a estudiar. Si cal estendre la superfície d'estudi, aquesta extensió es realitza a partir de punts adjacents previs, tal i com es podrà veure més endavant.

S'ha realitzat una primera sèrie d'experiments per a la que s'ha triat un marge de temperatures d'estudi entre 10 i 50 °C, ja que en el disseny factorial complet s'ha comprovat que a 0 °C el rendiment de la reacció decreix, i a temperatures superiors a 50 °C la velocitat de descomposició del glicol podria començar a ser important. Pel que fa a la concentració de Zn s'ha estudiat el marge entre 2 i 4 vegades la concentració indicada a la metòdica. Els resultats obtinguts han permès definir una superfície de resposta que es mostra a la figura 2.21, on es presenten la representació tridimensional de la mateixa i la projecció en dos dimensions de les corbes d'isorendiment. I han permès determinar un màxim, calculat matemàticament, que correspondria a un 73.3% de rendiment a unes condicions de 23.4 °C i una concentració de Zn de 3.13 vegades l'explicitada a la metòdica.

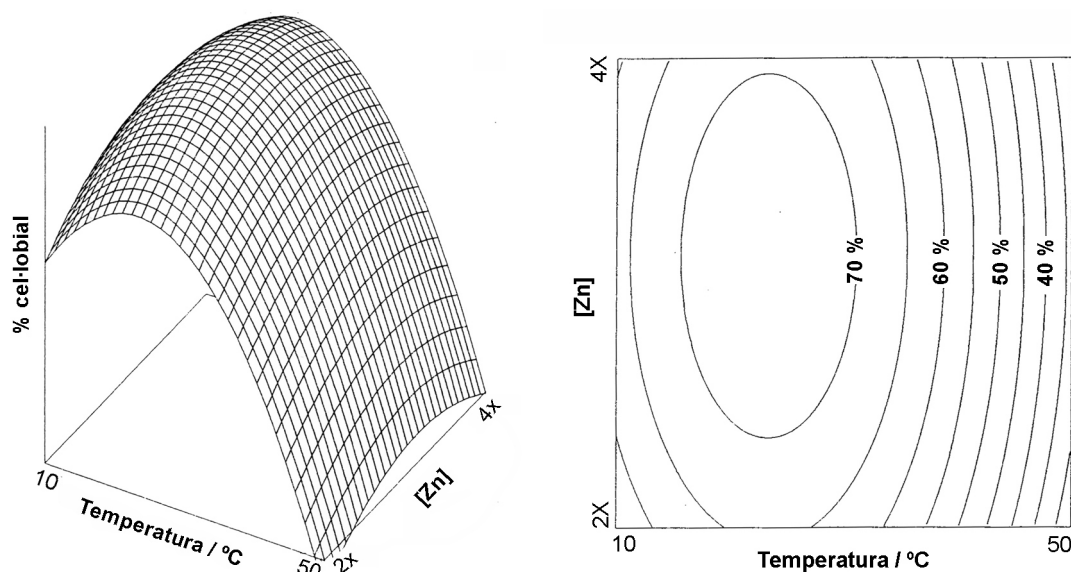


Figura 2.21. Resultats de l'estudi d'optimització de la reacció de Helferich seguint el mètode de Doehlert. Esquerra: superfície tridimensional en què es representa el rendiment obtingut en la síntesi de cel·lobial per-*O*-acetilat (**51**) en funció de la temperatura i la concentració de Zn. Dreta: Projecció en dos dimensions de les corbes d'isorendiment en funció de la concentració de Zn i de la temperatura, amb variacions entre corbes del 5%.

Al gràfic bidimensional es comprova que la superfície de resposta presenta un màxim molt ampli, comprès a temperatures entre 16 i 30 °C, i a una concentració de Zn entre 2.4 i 4.0 vegades superior a la descrita a la metòdica. Per tal d'acabar de definir la superfície a baixes temperatures es decideix incloure tres experiments més, a temperatures entre 0 i 10 °C i concentracions de Zn entre 3 i 5 vegades superiors a la indicada a la metòdica, definint una nova matriu de disseny, que es mostra a la figura 2.22. En aquesta figura es mostren les condicions de reaccions emprades en cada experiment, així com els rendiments obtinguts. Es comprova com les noves experiències realitzades defineixen una zona plana de rendiment al voltant del 60%, i que el millor rendiment obtingut experimentalment en l'optimització és del 71%, que és més del doble del rendiment obtingut prèviament en la síntesi del cel·lobial per-*O*-acetilat (**51**) fent servir la metòdica original, que és del 30% (Glòria Villalonga, comunicació personal).

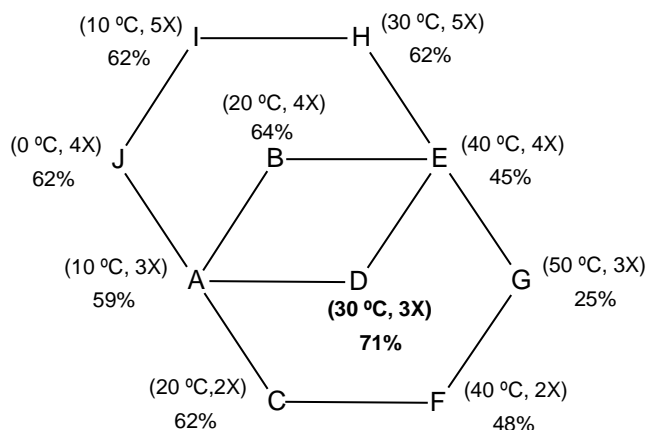


Figura 2.22. Disseny d'experiències de Doehlert per tal d'optimitzar la concentració de Zn i la temperatura de la reacció en la síntesi del cel·lobiosal per-*O*-acetilat (**51**) seguint el mètode de Helferich. Es presenten els valors que adopten els dos factors en estudi en cada experiència i el rendiment obtingut en cada reacció.

Abans d'aplicar aquestes condicions a la síntesi del glicol trisacàrid **42** s'ha realitzat un petit estudi amb el bromur de laminaribiosa per-*O*-acetilat (**52**), amb la finalitat de determinar si el fet de canviar la posició de la substitució en la unitat de glucopiranososa reduïda afecta la dependència dels factors experimentals sobre el rendiment de la reacció. En el glicol que s'obté fent servir aquest substrat, a l'igual que en el cas del trisacàrid **42**, la unitat que sustenta el doble enllaç està 3-*O*-substituïda i ja s'ha observat amb anterioritat que en la síntesi d'aquests compostos es donen una sèrie de reaccions secundàries que porten a una disminució del rendiment del producte d'interès. Com les condicions òptimes en el cas del cel·lobiosal **51** es troben a l'hexàgon definit per les experiències A-G, i un excés de Zn, no ofereix millores sensibles de rendiment, s'han escollit les condicions experimentals recollides en aquest hexàgon per tal d'aplicar-les a la síntesi del laminaribiosal per-*O*-acetilat (**53**) (figura 2.23).

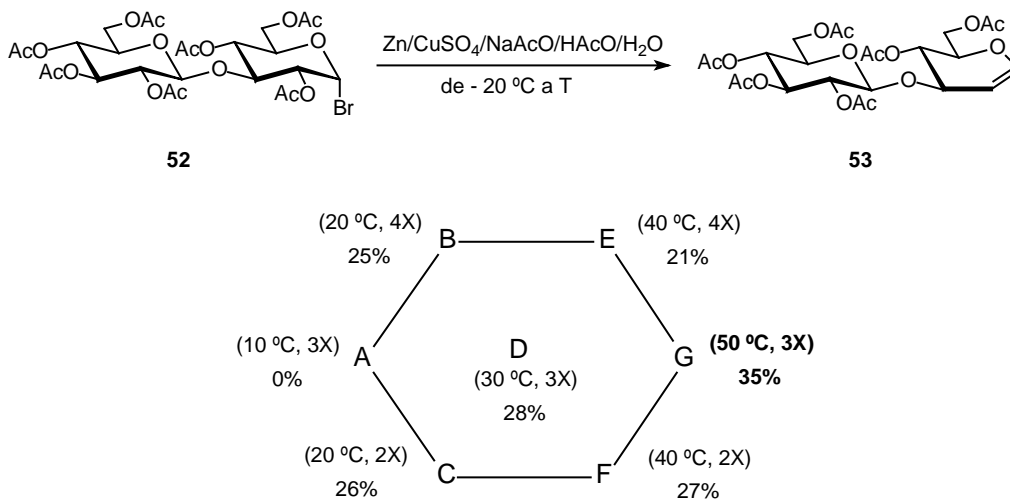


Figura 2.23. A dalt: Síntesi del laminaribiosal per-*O*-acetilat (**53**) partint del bromur de laminaribiosa per-*O*-acetilada (**52**). A baix: Disseny d'experiències de Doehlert per tal d'optimitzar la concentració de Zn i la temperatura de la reacció en la síntesi del laminaribiosal **53** seguint el mètode de Helferich. S'indiquen els valors que adopten els dos factors en estudi en cada experiència, i el rendiment obtingut.

A partir dels rendiments que es mostren a la figura 2.23 s'observa que no només disminueix el rendiment de síntesi del laminaribial **53** enfront de l'obtingut per al cel-lobial **51**, sinó que també varia la dependència del rendiment de síntesi del glicol enfront de les condicions experimentals. S'ha comprovat que la concentració de Zn en aquest cas no és un factor important, i que l'òptim de temperatura s'ha desplaçat cap a temperatures més elevades. En vista dels resultats obtinguts en la síntesi del laminaribial **53** s'ha decidit acabar d'afinar les condicions de reacció sobre el glicol trisacàrid d'interès (G4G3G')_{Ac}, i tenint en compte que la concentració de Zn no és un factor determinant, es fixa en una concentració 3 vegades superior a la descrita a la metodologia original (concentració a la que s'ha obtingut el millor rendiment per a la síntesi del cel-lobial **51**), i s'han realitzat una sèrie d'experiments per tal de definir l'òptim de temperatura. Prenent com a punt de partida 25 °C s'ha assajat la reacció a quatre temperatures superiors (35, 50, 60 i 70 °C), arribant a la conclusió que la temperatura òptima per a la síntesi del glicol **42** és de 50 °C (figura 2.24).

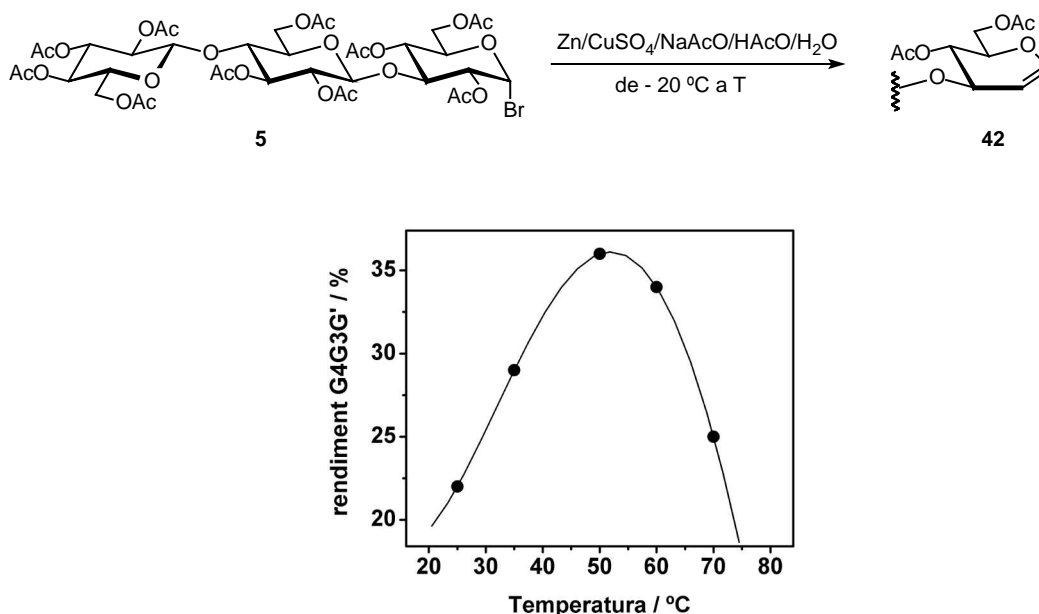


Figura 2.24. A dalt: Reacció de Helferich aplicada a la síntesi del glicol **42** a partir del bromur de trisacàrid **5**. A baix: Representació del rendiment de síntesi del glicol trisacàrid **42** enfront de la temperatura de reacció.

Amb els diferents experiments realitzats en la síntesi dels tres glicols **42**, **51** i **53**, es constata que en el cas dels glicols 3-*O*-substituïts el rendiment de reacció és menys sensible a la variació de les condicions experimentals. De tota manera, el rendiment màxim assolit en la síntesi del trisacàrid **42** després d'una etapa de purificació cromatogràfica, del 36%, queda lluny del rendiment màxim al que s'arriba en la síntesi del cel-lobial **51**, que és d'un 71%.

2.5.1.3. Estudi d'altres mètodes de síntesi de glicals*Reducció electroquímica.*

S'ha assajat una adaptació del mètode descrit per a la reducció electroquímica de bromurs de glicosil acetilats en dissolvents apròtics [264]. Les primeres proves s'han realitzat a nivell qualitatiu sobre l'acetobromoglucosa (**29**) fent servir un ànode de grafit, un càtode de Pb i l'elèctrode de referència Ag/Ag⁺. Dels dos dissolvents emprats, dimetilformamida i acetonitril, amb el primer s'han obtingut resultats més reproduïbles, tant a nivell de voltamperometria cíclica, per tal de determinar el potencial de semireducció, com en la reproduïbilitat de la reacció. En canvi, la purificació posterior del producte és més complexa i porta associada una major pèrdua de rendiment. Independentment del dissolvent emprat, en tots els casos s'ha obtingut el glucal acetilat (**43**) com a producte majoritari per c.c.f.

La reducció del bromur trisacàrid **5** s'ha realitzat en el mateix sistema fent servir acetonitril com a dissolvent i tetrafluoroborat de tetrabutilamoni (TBABF₄) com a electròlit conductor i la reducció s'ha dut a terme a un voltatge constant de -1.45 V (figura 2.25). El rendiment obtingut és del 32%, però només s'ha aconseguit obtenir el glicol **42** treballant en l'escala dels centenars de mg. En escalar la reacció per tal de treballar a nivell de grams sembla que el càtode es passiva i, en aquests casos, s'ha obtingut majoritàriament el producte d'hidròlisi del bromur de glicosil **26**. Maran *et al.* han observat que la reducció electroquímica en presència d'un àcid permet millorar molt el rendiment de la reacció [264]. L'addició d'àcid acètic al medi de reacció ha permès obtenir el glicol trisacàrid **42** amb un 44% de rendiment, però sempre treballant a petita escala. Tot i el bon rendiment obtingut en aquestes proves, la manca de reproduïbilitat d'aquesta reacció electroquímica, juntament amb la dificultat a l'hora d'escalar-la, desaconsellen aquest mètode per a l'obtenció del glicol **42** a gran escala.

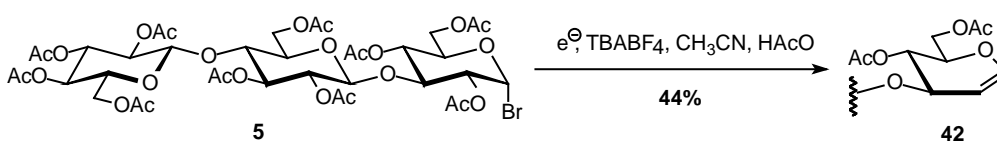


Figura 2.25. Síntesi del glicol **42** per reducció electroquímica.

Reducció amb sals organometàl·liques de titani.

Aquest mètode substitueix el Zn emprat generalment en la reducció de bromurs de glicosil per clorur de bis(ciclopentadienil) titani(III), Cp₂TiCl [275, 276]. En la formació d'aquest reactiu es fa necessària la presència d'un dissolvent amb parells electrònics lliures a fi d'estabilitzar la forma monomèrica del reactiu, que és la que reacciona amb el bromur, enfront del dímer, que és la seva forma més estable [277] (figura 2.26).

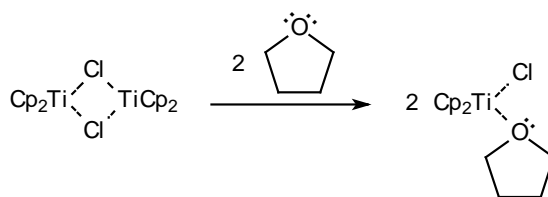


Figura 2.26. Formació de l'espècie reductora Cp_2TiCl amb ajuda del dissolvent.

La principal dificultat que presenta el mètode original és l'elevada inestabilitat del reactiu organometàl·lic en presència d'aire, de manera que tota la manipulació del producte, inclosa la reacció de reducció, s'ha de realitzar en atmosfera inerta. Skrydstrup *et al.* [278] descriuen un mètode de generar *in situ* el reactiu reductor a partir de la sal de titani(IV) Cp_2TiCl_2 , i Mn, que també dóna bons rendiments en la síntesi de glicals i permet treballar en condicions no inertes.

En una primera prova, l'aplicació d'aquesta metodologia a la reducció de l'acetobromoglucosa ha permès obtenir el glucal **43** de forma quantitativa segons c.c.f. Posteriorment s'ha obtingut la síntesi dels glicals trisacàrid **42** i tetrasacàrid **54** amb un rendiment del 59% i 50%, respectivament (figura 2.27). Aquests són els millors rendiments aconseguits fins al moment en el grup per a la síntesi de glicals d'oligosacàrids 3-*O*-substituïts.

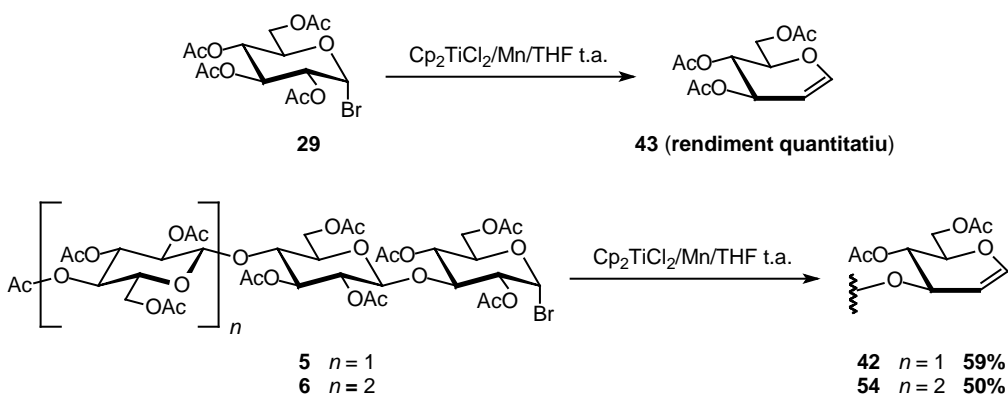


Figura 2.27. Reducció de bromurs de glicosil acetilats amb sals organometàl·liques de titani.

2.5.2. Desprotecció de glicals per-*O*-acetilats

En totes les desproteccions de glicals acetilats que s'havien realitzat al Laboratori de Bioquímica abans d'iniciar la present tesi s'havia utilitzat la transesterificació de Zemplén (NaOMe/MeOH), obtenint rendiments del 76% tant per a la desprotecció del cel·lobial per-*O*-acetilat **51** (Glòria Villalonga, comunicació personal), com per a la del glicol trisacàrid **42** [223]. Aquesta desprotecció, quan s'optimitza, sol presentar uns rendiments quantitius; i, donada la coneguda labilitat dels glicals en condicions àcides, s'ha plantejat la possibilitat de variar el processament de la reacció, per tal d'evitar l'ús de la reina àcida habitualment emprada en la neutralització del medi de reacció.

En una variant del processament del cru de reacció de la reacció de Zemplen s'ha emprat CO₂ sòlid per tal de neutralitzar el medi de reacció. D'aquesta manera, després d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda a 0 °C, el producte de reacció es troba impurificat amb bicarbonat. La purificació posterior s'ha realitzat per cromatografia de columna sobre sílice emprant com eluent la barreja MeOH/H₂O (1:3). Els rendiments obtinguts són del 73% per a l'obtenció del cel·lobial (**55**), i del 93% per a la desprotecció del glicol **42**. D'altra banda, l'aplicació en un experiment paral·lel de la metodologia clàssica de la transesterificació de Zemplen sobre el glicol **42**, ha permès l'obtenció del glicol desprotegit d'interès **56** amb un rendiment del 85%, després de recristal·lització. Sembla, per tant, que la neutralització del medi de reacció amb CO₂(s), introdueix una lleugera millora del rendiment, per bé que implica una purificació del producte més complexa.

Prenent com a producte de partida el cel·lobial per-*O*-acetilat **51** s'ha assajat també una alternativa a la transesterificació de Zemplen, emprant MeOH/HCl(g) en la seva desprotecció. Si bé s'ha comprovat per c.c.f. que després de 24 hores de reacció s'obté el glicol d'interès, aquest descomposa durant l'etapa d'eliminació de dissolvent a pressió reduïda, tot i que aquest procés es realitza a 0 °C.

2.6. Síntesi del 4'-nitrofenil *O*-β-D-glucopiranosil-(1→4)-*O*-β-D-glucopiranosil-(1→4)-*O*-β-D-glucopiranosil-(1→3)-2-desoxi-β-D-glucopiranosid (**68**)

La síntesi de 2-desoxiglicòsids és un cas especial en la síntesi de carbohidrats. Quan aquests actuen com a donadors en una reacció de glicosidació l'estereoquímica del producte resultant ve dictada només per l'efecte anomèric, ja que el fet de disposar de dos protons com a substituents a C2 impedeix que pugui donar-se l'assistència anquimèrica. Com a resultat, per tant, s'obté majoritàriament l'anòmer α, fet especialment problemàtic en la síntesi dels 2-desoxi-β-glicòsids. S'han desenvolupat diferents estratègies per a superar aquesta limitació que estan recollides en diferents articles de revisió [279-281].

2.6.1. Mètodes de síntesi de 2-desoxi-β-glicòsids

Dels diferents mètodes descrits el que s'empra de forma més generalitzada és el d'introducció temporal d'un grup participant a C2 que posteriorment s'elimina per reducció, ja que sense gran complicació sintètica s'obté l'anòmer β amb una elevada estereoselectivitat (figura 2.28).

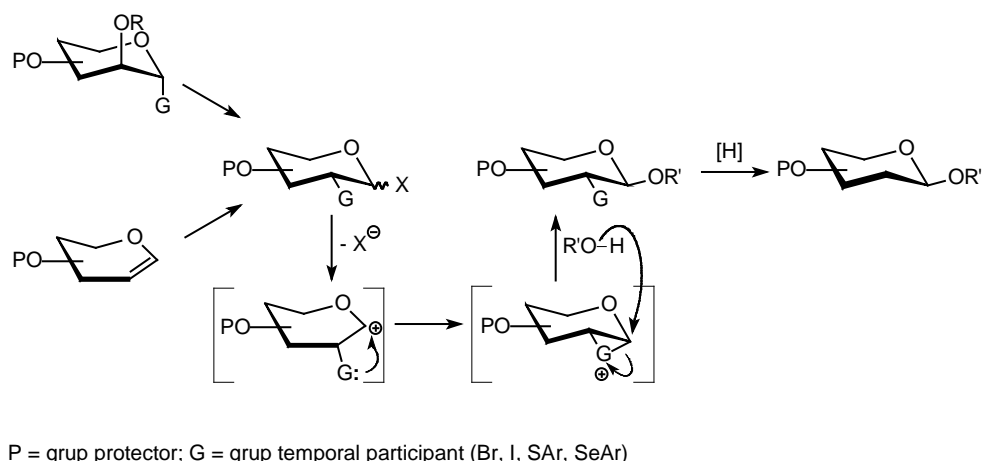


Figura 2.28. Síntesi de 2-desoxi- β -glicòsids introduint temporalment un grup participant a C2.

2.6.2. Síntesi d'aril 2-desoxi- β -glicòsids

El fet que el nucleòfil en la reacció de glicosidació sigui un fenol introdueix nous problemes, donada la seva reduïda nucleofília. S'ha observat que en aplicar els mètodes propis de la síntesi d'alquil 2-desoxi- β -glicòsids a la síntesi d'aril 2-desoxi- β -glicòsids s'obté majoritàriament l'anòmer α , ja que els fenols, en comptes de reaccionar amb el catió de glicosil en què el grup assistent es troba estabilitzant la càrrega generada, reaccionen amb la forma en què no hi ha assistència per grup veí (estructura B de la figura 2.29), que en ser més inestable és també més reactiva.

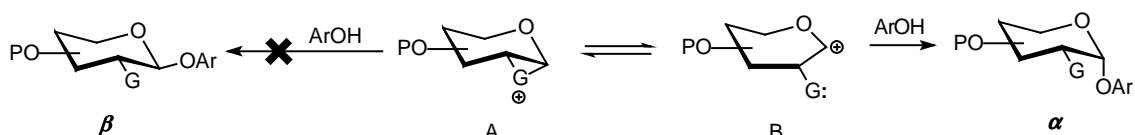


Figura 2.29. Síntesi de 2-desoxi- β -glicòsids emprant un fenol com a acceptor glicosídic. L'estructura A representa la forma del catió de glicosil en què el grup assistent participa en l'estabilització de la càrrega, mentre que en la forma B el grup a C2 no participa en l'estabilització.

De les diferents metodologies desenvolupades per a la síntesi d'aril 2-desoxi- β -glicòsids en destaquen quatre. Dues d'elles parteixen d'un glicol com a donador glicosídic, mentre que les altres dues parteixen d'un glicòsid en què els substituents a C1 i C2 formen un heterocicle amb configuració α - al carboni anomèric.

Formació d'estannilèters sobre el nucleòfil.

Aquesta estratègia es basa en l'augment de la nucleofília del fenol per formació del corresponent tributilestannilèter [282]. A continuació, l'addició sobre el doble enllaç d'un glicol del fenol procedent de l'estannilèter i d'un grup tiofenil provinent d'una sal de sofre present en el medi, rendeixen el producte de glicosidació amb una

estereoselectivitat $\beta:\alpha$ de 3 a 1. Després de la glicosidació s'ha de realitzar una eliminació reductiva del tiosubstituent que s'ha introduït a C2 per tal d'obtenir el producte d'interès (figura 2.30).

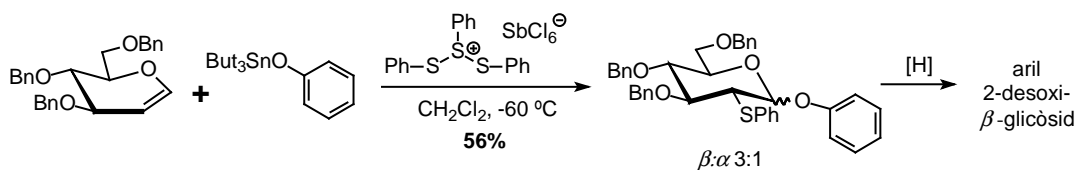


Figura 2.30. Utilització d'arilestannilèters en la síntesi d'aril 2-desoxi- β -glicòsids.

Glicosidació emprant la reacció de Mitsunobu.

Roush i Lin apliquen la reacció de Mitsunobu a la síntesi d'aril 2-desoxi- β -glicòsids [283], introduint en un glicol un grup feniltio o fenilseleno equatorial a C2 (figura 2.31). D'aquesta manera estableixen l'anòmer α del donador glicosídic hemiacetàlic, i fan que la formació de l'enllaç glicosídic es doni a través del mecanisme S_N2 de la reacció de Mitsunobu. Així obtenen el producte d'interès amb una estereoselectivitat $\beta:\alpha$ igual o superior a 7 a 1. Posteriorment s'ha d'eliminar el grup a C2 reductivament.

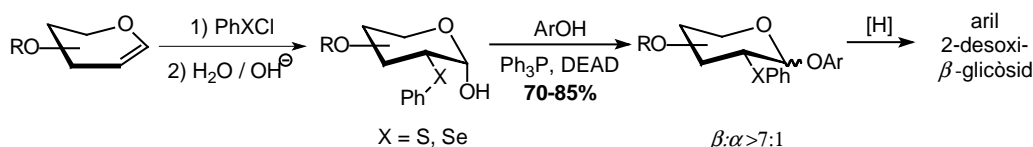


Figura 2.31. Síntesi d'aril 2-desoxi- β -glicòsids emprant la reacció de Mitsunobu.

Obertura de 1,2-anhidroglicòsids.

Aquesta metodologia es basa en l'obertura d'un 1,2-anhidroglicòsid amb estereoquímica α per reacció amb el fenòxid d'interès sota condicions de catàlisi per transferència de fase sòlid-líquid [284] (figura 2.32). Posteriorment s'elimina el grup hidroxil, generat a C2 en l'obertura de l'epòxid, per formació del pentafluorofeniltiocarbonat corresponent i reducció radicalària del mateix [285], obtenint estereoespecíficament l'aril 2-desoxi- β -glicòsid d'interès.

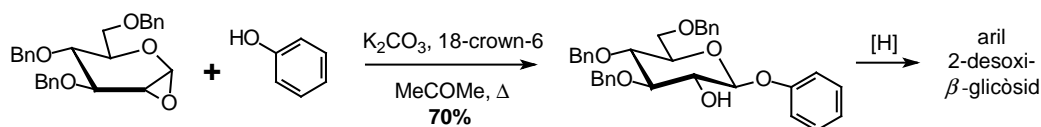


Figura 2.32. Síntesi d'aril 2-desoxi- β -glicòsids per obertura de 1,2-anhidroglicòsids.

Obertura d'oxitiodiens cíclics.

Franck i Marzabadi obtenen estereoespecíficament l'aril 2-desoxi- β -glicòsid d'interès per obertura d'un oxitiodiè cíclic amb estereoquímica α a C1 [286] (figura 2.33). En aquest cas, l'eliminació reductiva del grup generat a C2 per obertura del cicle va resultar problemàtica, disminuint considerablement el rendiment global del procés.

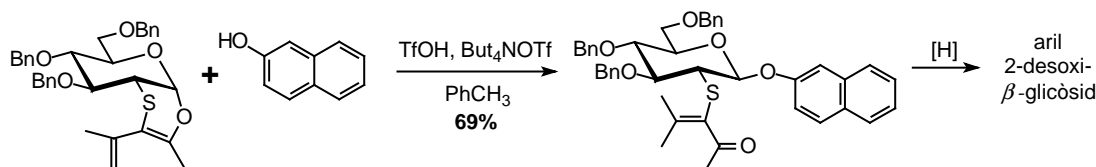


Figura 2.33. Síntesi d'aril 2-desoxi- β -glicòsids per obertura d'oxitiodiens cíclics.

Dels quatre mètodes descrits, el principal avantatge dels dos darrers és que la reacció és estereoespecífica per a l'anòmer β , tanmateix la síntesi dels corresponents donadors glicosídics no és trivial. La formació de l' α -anhidroglicòsid és molt dependent dels grups protectors [287] i especialment problemàtica en presència de grups acetil (que, per qüestions pràctiques, solen ser els grups protectors emprats en el grup de treball), i la síntesi del donador oxitiodiè cíclic implica un nombre força més elevat d'etapes sintètiques que en el cas dels altres donadors. L'opció d'augmentar la nucleofília del fenol no sembla representar majors problemes sintètics però ofereix una estereoselectivitat insuficient. L'aplicació del mètode de Mitsunobu sembla la més indicada per a la síntesi del producte d'interès, considerant tant la dificultat sintètica, com l'estereoselectivitat del producte de reacció.

Aprofundint en aquest darrer mètode, sembla que l'ús del grup fenilseleno ofereix una major selectivitat que l'ús del grup feniltio [283]. I que l'estereoselectivitat de l'addició del grup PhSeCl o PhSCl sobre el doble enllaç és altament dependent dels grups protectors presents al glicol. Per tal d'afavorir al màxim l'obtenció del donador amb configuració *gluco*- sobre la configuració *manno*-, el substituent a C6 ha de ser altament electronegatiu, el grup protector a C4 ha de ser un grup polar, i el grup a C3 ha de ser cessor. Una unitat sacarídica a C3 també garanteix una elevada estereoselectivitat [288].

2.6.3. Síntesi del 4'-nitrofenil *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-D-glucopiranosid (**67**)

Es va plantejar la síntesi del 2-desoxi- β -glicòsid **67** fent servir dues estratègies diferents (figura 2.34). D'una banda, funcionalitzar el glicol tetrasacàrid d'interès després de l'addició d'un grup participant a C2; o de l'altra, partint d'un glucal obtenir un 2-desoxi- β -monosacàrid cromofòric, que posteriorment s'hauria de desprotegir selectivament a C3 i actuaria com acceptor glicosídic en una reacció de glicosidació, per tal de construir l'estructura oligosacarídica desitjada. En les dues estratègies, la des-*O*-acetilació final del compost **67** rendiria el 2-desoxiglicòsid d'interès **68**.

Tot i que les dues estratègies sintètiques comporten el mateix nombre d'etapes, la tria s'ha decantat per la via que parteix del glucal per-*O*-acetilat (**43**). La raó és que aquest glucal és un compost comercialment assequible, mentre que la síntesi del glicol tetrasacàrid **54** d'una banda és una reacció que no presenta gaire bons rendiments (en el moment de plantejar la síntesi del compost **67** encara s'estava treballant en els diferents mètodes de síntesi del glicol trisacàrid **42**), i de l'altra, parteix del tetrasacàrid acetilat **4**, que és un compost d'elevat valor afegit.

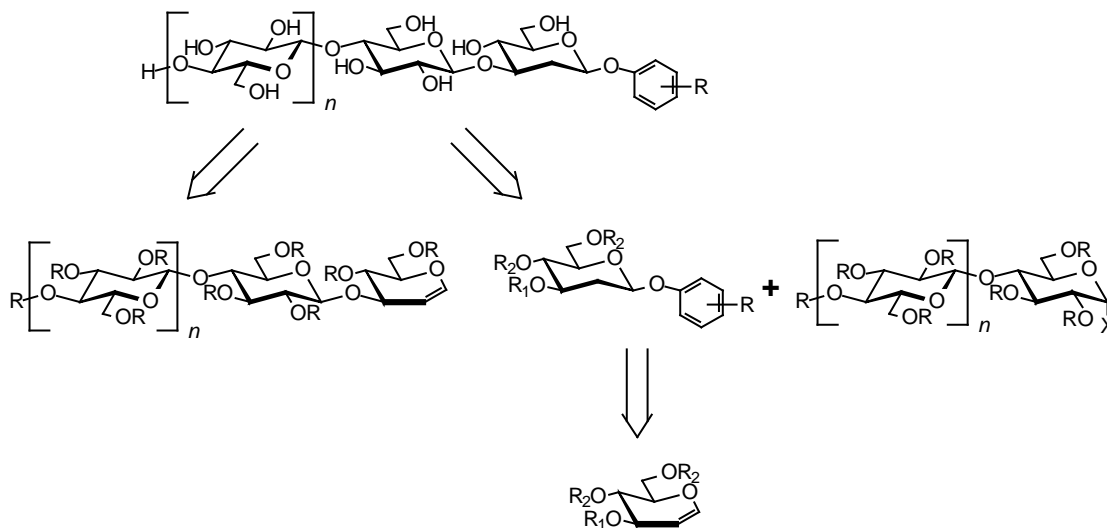


Figura 2.34. Anàlisi retrosintètica per a l'obtenció d'aril β -2-desoxioligosacàrids d'estructura general $[\beta$ -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)]_n- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -D-2-desoxi-Glcp.

2.6.3.1. Intents de síntesi del donador de glicosidació **59**

Tal i com s'ha exposat a l'apartat 2.5.1.1, el glucal per-*O*-acetilat (**43**) s'ha desprotegit regioselectivament en la posició 3 fent servir la lipasa PS de la casa comercial "Amano". En aquesta posició s'ha introduït posteriorment un grup cessor, el grup *tert*-butildifenilsilil (TBDPS) en diclorometà, fent servir com a catalitzador la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) [289]. Després de 63 hores de reacció, la lentitud del seu progrés (60% de conversió estimat per c.c.f.) va plantejar un canvi de sistema a imidazole/DMF [290] assolint el producte d'interès **57**, 4 hores i 30 minuts més tard, amb un 93% de rendiment global (figura 2.35). La presència d'un multiplet a 7.36-7.76 ppm i un singlet a 1.05 ppm a l'espectre de ¹H-RMN ratifiquen la introducció del grup *tert*-butildifenilsilil a C3.

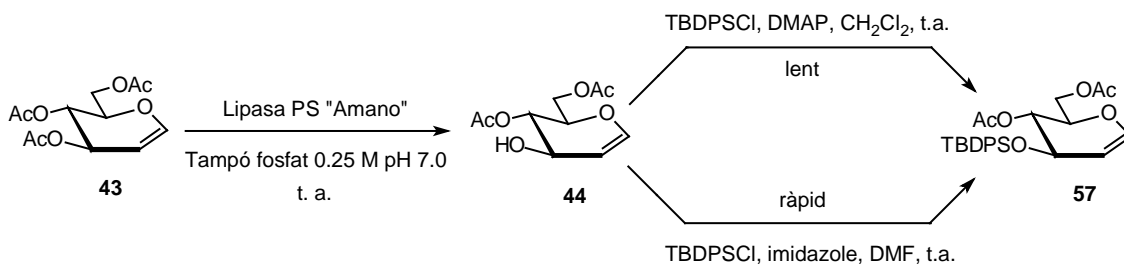


Figura 2.35. Primeres etapes de la síntesi del donador glicosídic **59**.

El tractament del compost **57** amb PhSeCl en diclorometà anhidre a 0 °C, ha portat a la formació de dos nous productes, sent un d'ells molt majoritari (probablement d'anòmer amb configuració *gluco-*). Tanmateix l'intent d'hidròlisi del cru de reacció amb Ag₂CO₃ a temperatura ambient, o bé amb NaHCO₃ a 50 °C dóna lloc a una mescla de reacció complexa, de la que després d'una etapa de purificació no s'ha pogut aïllar el compost d'interès (**59**) (figura 2.36).

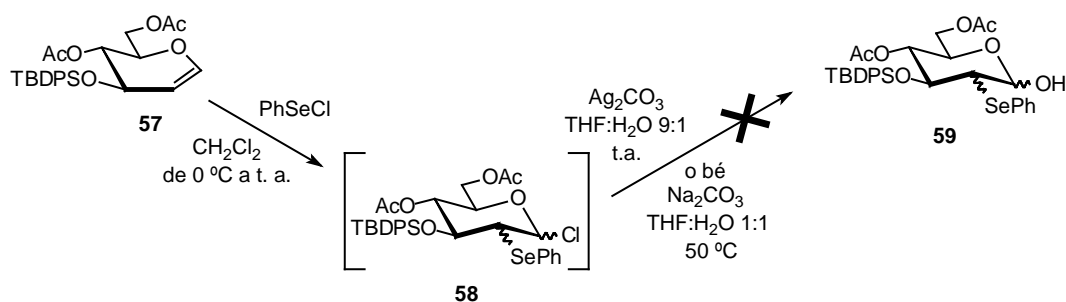


Figura 2.36. Intents de síntesi de l'hemiacetal **59** a partir del glucal **57**.

El fracàs d'aquesta estratègia ha plantejat l'opció d'estudiar la via que parteix del glicol del tetrasacàrid **54**. Els grups acetil emprats com a grups protectors acompleixen amb les condicions d'electronegativitat i polaritat requerides a C4 i C6 per tal d'afavorir la configuració *gluco-* en l'addició electròfila sobre el doble enllaç, de manera que s'ha fet servir el compost **54** com a producte de partida (figura 2.37).

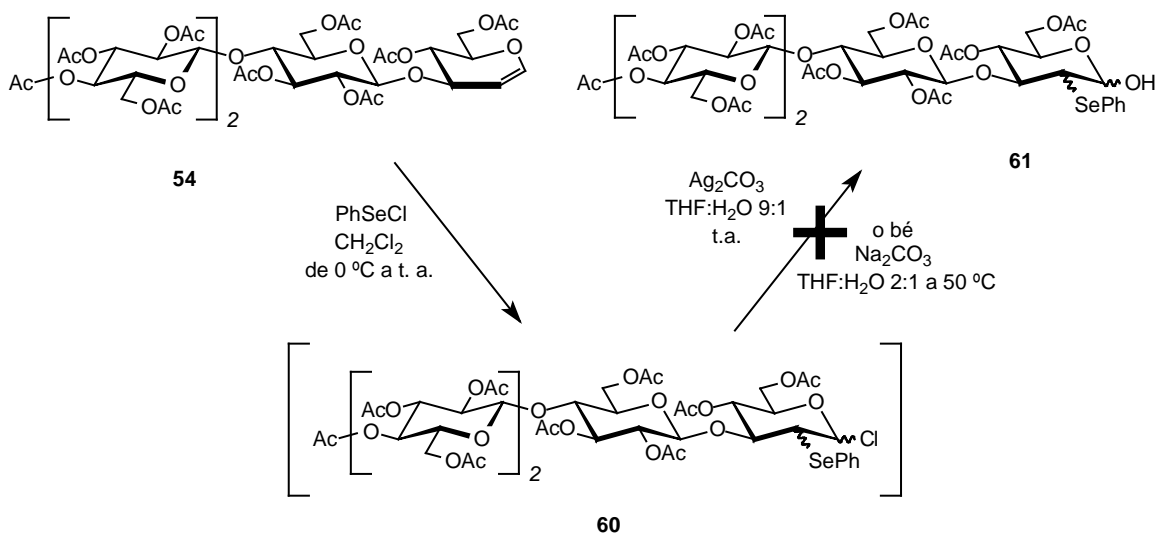


Figura 2.37. Intents de síntesi de l'hemiacetal **61** a partir del glicol **54**.

Fent servir les mateixes condicions que en el cas del glucal, per c.c.f. torna a observar-se la formació de dos compostos, essent un d'ells clarament majoritari. Però l'estratègia tornar a fallar a la mateixa etapa, de manera que no s'ha aconseguit obtenir el producte d'hidròlisi **61**, ni per tractament amb Ag_2CO_3 a temperatura ambient, ni amb NaHCO_3 a $50\text{ }^\circ\text{C}$. Tot i així a l'espectre del producte aïllat s'observa la introducció del grup fenilselenil, la qual cosa ha portat a pensar que la primera part de la reacció funciona correctament i el problema es troba en l'etapa d'hidròlisi del clorur.

2.6.3.2. *Glicosidació partint del glical **54** sense aïllar el donador glicosídic*

Amb aquesta presumpció s'ha fet un intent de glicosidació sense aïllar el donador, fent servir les condicions de transferència de fase emprades en la síntesi dels altres substrats cromofòrics. D'entrada s'ha fet reaccionar el glical **54** amb PhSeCl en diclorometà anhidre, i un cop acomplerta aquesta primera fase, s'ha addicionat una dissolució aquosa bàsica de l'acceptor glicosídic, en aquest cas la 4-metilumbel·liferona, i el catalitzador de transferència de fase (figura 2.38). La purificació del cru de reacció ha rendit el producte d'interès **62** amb un 4% de rendiment, identificat per la presència dels senyals corresponents a la 4-metilumbel·liferona i al grup fenilselenil a l'espectre de ^1H -RMN, però sense poder determinar l'estereoquímica de l'enllaç glicosídic format.

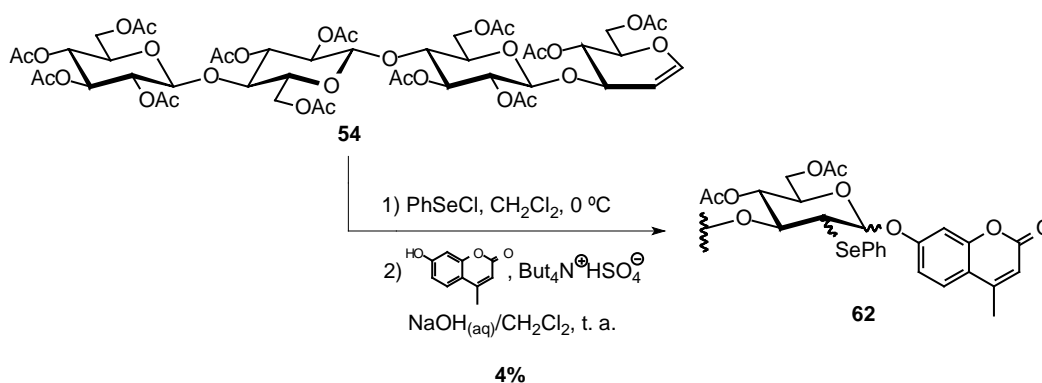


Figura 2.38. Síntesi del compost **62** per glicosidació directa des del glical **54**.

2.6.3.3. *Obtenció del 2-desoxi tetrasacàrid **67** emprant α-iodurs de glicosil com a donadors glicosídics*

La fallida en l'obtenció del donador glicosídic per tal d'aplicar el mètode de Roush i Lin, i el baix rendiment obtingut en l'intent de glicosidació sobre el producte generat en la primera etapa han plantejat la necessitat de buscar una alternativa que permeti l'obtenció del producte de manera més eficient. Al 1997, aprofitant la idea de fer que la reacció de glicosidació es transformi en una reacció del tipus $\text{S}_{\text{N}}2$, es descriuen addicions nucleòfiles sobre α-iodurs de glicosil que reneixen majoritàriament el producte de glicosidació amb estereoquímica β [291]. Aquest és el cas de l'addició del fenol sobre el iodur de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-α-*D*-glucopiranosil, que sense assistència anquimèrica, reneix el fenil β-glicòsid amb un 61% de rendiment (figura 2.39).

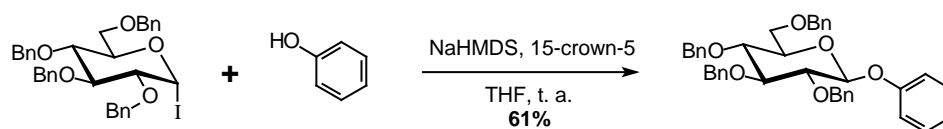


Figura 2.39. Obtenció de β -glicòsids emprant com a donadors α -iodurs de glicosil.

Aquesta metodologia ha ofert una nova opció per a la síntesi de l'aril 2-desoxi- β -glicòsid **67**, i donat que la utilització d'halurs de glicosil com a donadors de glicosidació fins al moment havia donat bons resultats en el grup, s'ha decidit explorar aquesta nova via. S'ha plantejat la síntesi del iodur de glicosil (G4G4G3(2dG))_{Ac}-I (**66**) en quatre etapes de reacció a partir del glical **54**. Les dues primeres etapes consisteixen en una mercuració-desmercuració reductiva en un procés *one-pot* [292]. L'addició d'acetat de mercuri(II) al doble enllaç del glical genera l'intermedi organomercúric **63** que és reduït amb NaBH₄ per tal de formar el 2-desoxitetrasacàrid **64**. Segons l'article original, l'etapa de reducció és especialment delicada, recomanant una durada exacta d'un minut. El producte **64** s'ha obtingut a partir del glical **54**, amb un rendiment del 47%, i la seva estructura s'ha confirmat per espectroscòpia de RMN amb un experiment DEPT, que mostra la presència d'un nou grup -CH₂- a 35.3 ppm en el 2-desoxi- β -glicòsid.

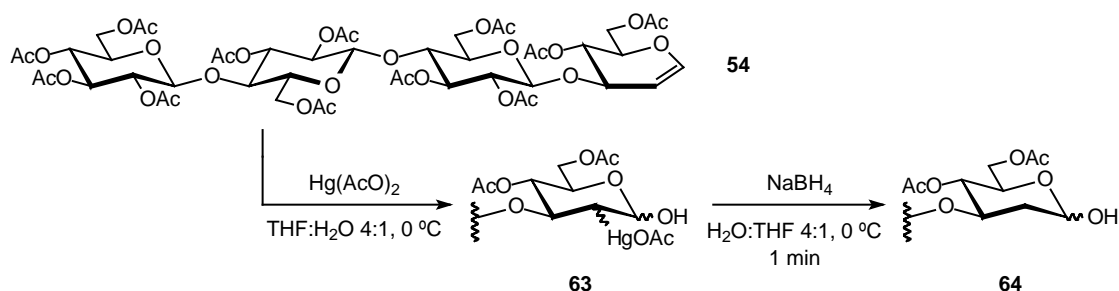


Figura 2.40. Mercuració-desmercuració reductiva del glical **54**, rendiment: 47%.

Síntesi del iodur de glicosil 66. L'acetilació de l'hidroxil anomèric, prèvia a la síntesi del iodur de glicosil, s'ha realitzat amb el sistema Ac₂O/Py i amb un rendiment del 99%. A continuació, el tractament d'una dissolució del producte **65** en diclorometà amb quantitats estequiomètriques de iodotrimetilsilà a 0 °C ha rendit el iodur **66** de forma quantitativa [293] (figura 2.41). L'avantatge que ofereix aquest mètode és que tant l'excés de reactiu com el subproducte generat en la reacció, l'acetat de trimetilsilil, poden eliminar-se per destil·lació a pressió reduïda, permetent aïllar fàcilment el producte de reacció. Donada la inestabilitat del compost **66**, aquest s'ha fet servir directament en la següent etapa de reacció, sense caracterització prèvia.

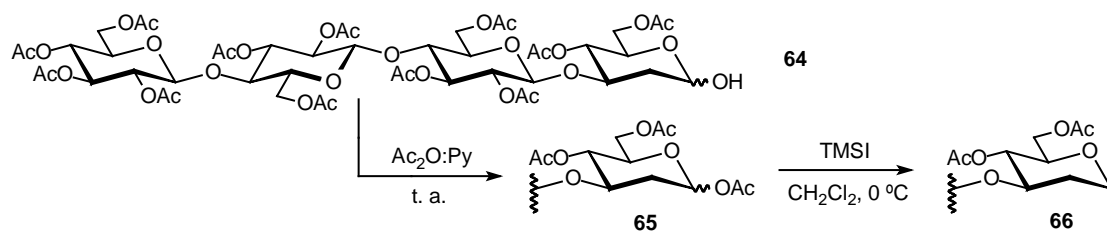


Figura 2.41. Síntesi del iodur de glicosil **66** a partir del tetrasacàrid **64**.

Substitució nucleòfila amb 4-nitrofenol. La glicosidació s'ha realitzat en diclorometà a temperatura ambient i el 4-nitrofenòxid s'ha generat *in situ* afegint hexametildisilazanat sòdic (NaHMDS) a la dissolució del donador glicosídic i el 4-nitrofenol (figura 2.42). Per tal d'augmentar la solubilitat del fenòxid s'ha addicionat un èter corona a la reacció.

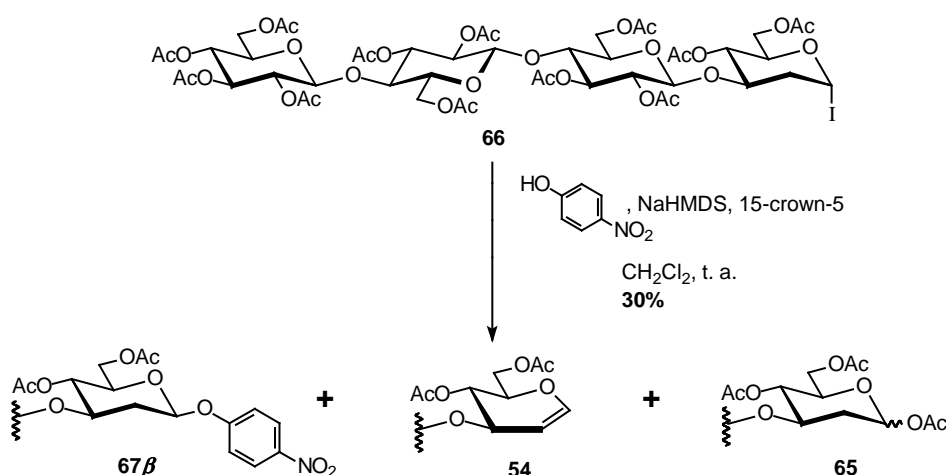


Figura 2.42. Productes obtinguts en la substitució nucleòfila sobre el iodur de glicosil **66**.

El producte de glicosidació **67**, identificat a partir dels senyals aromàtics, s'ha obtingut amb un 30% de rendiment i amb una estereoselectivitat $\beta:\alpha$ superior a 20:1. Com a principals subproductes de reacció s'han obtingut el glical **54**, format per deshidrohalogenació catalitzada per base, i el tetrasacàrid per-*O*-acetilat **68**, possiblement generat per restes d'acetat de trimetilsilil presents en el medi.

2.6.4. Des-*O*-acetilació dels grups hidroxil

El tetrasacàrid final **68** s'ha obtingut per tractament del producte **67** amb metòxid sòdic en metanol anhidre, amb un 88% de rendiment a partir del producte acetilat.

2.6.5. Ruta final de síntesi del 4'-nitrofenil 2-desoxi- β -glicòsid **68**

Després de totes les vies de síntesi explorades, la ruta final de síntesi d'aril 2-desoxi- β -D-glicòsids desenvolupada es mostra a la figura 2.43 per al cas concret del 4'-nitrofenil oligosacàrid **68**, sintetitzat en el present treball.

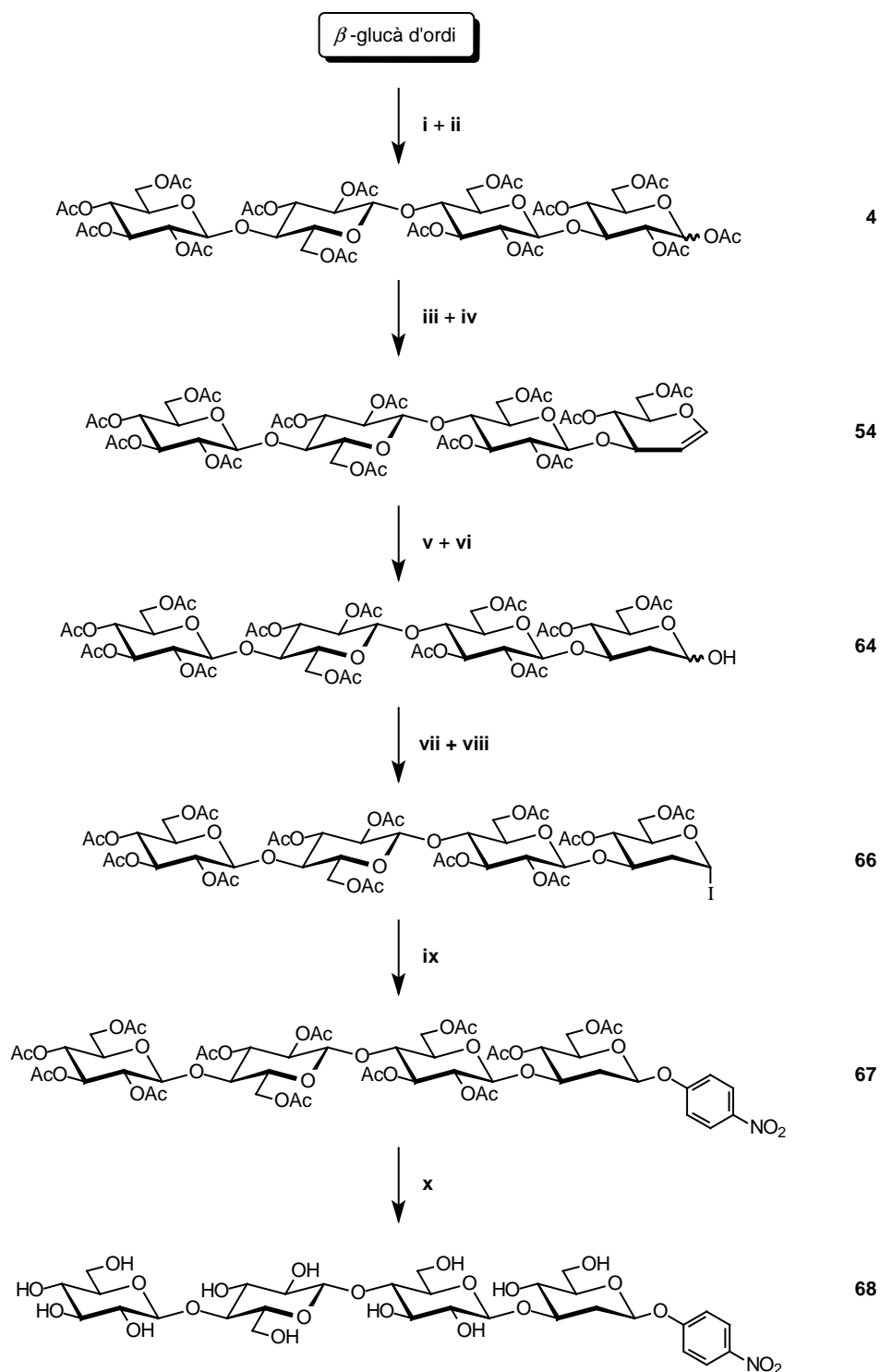


Figura 2.43. Etapes de síntesi per a l'obtenció del 2-desoxianàleg G4G4G3(2dG)-4NP. **i)** 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, 40 °C, 19 h; **ii)** Ac₂O/Py (1:1), t.a., 24 h, separació cromatogràfica (rendiment etapes i+ii: 30% en pes); **iii)** HBr/HAcO 33%, t.a., 30 min (99%); **iv)** Cp₂TiCl₂, Mn en pols, THF, t.a., atm. N₂, 13 h, (50%); **v)** Hg(AcO)₂, THF/H₂O (4:1), 0 °C, 45 min; **vi)** NaBH₄, H₂O/THF (4:1), 0 °C, 1 min (rendiment **v** + **vi**: 47%); **vii)** Ac₂O/Py (1:1), t.a., 7 h (99%); **viii)** TMSI, CH₂Cl₂, 0 °C, atm. N₂, 45 min; **ix)** 4NP, NaHMDS, 15-crown-5, THF, t.a., 45 min (rendiment **viii** + **ix**: 30%); **x)** NaOMe/MeOH 20 mM, t.a., 13.5 h (88%).

Capítol 3. Hidratació de glicals

3.1. Glicals com a inhibidors i pseudosubstrats de glicosidases

Els inhibidors enzimàtics competitiu se subdivideixen en dos grans grups en funció de la seva estructura. Aquells inhibidors amb una estructura semblant als substrats naturals de l'enzim s'anomenen anàlegs al substrat, i no solen caracteritzar-se per constants d'inhibició (enteses com a constants de dissociació) gaire baixes. Per contra, aquells inhibidors amb una estructura estereoquímica i/o electrònica similar a l'estat de transició de la reacció, s'anomenen anàlegs a l'estat de transició, i solen caracteritzar-se per constants d'inhibició bastant baixes, de l'ordre de micromolar o inferiors. Aquesta diferenciació es basa en la teoria que postula que la catàlisi enzimàtica pot explicar-se en base a una major complementaritat del centre actiu de l'enzim a l'estructura de l'estat de transició que a l'estructura del substrat en el seu estat fonamental [294, 295]. Sota aquesta premissa, els inhibidors anàlegs a l'estat de transició s'han utilitzat com a eina addicional per tal d'aprofundir en el mecanisme de les reaccions enzimàtiques.

En el cas de les glicosidases, com ja s'ha esmentat a la introducció, s'ha establert, en diferents enzims i emprant diverses metodologies, el caràcter oxocarbocatiònic de l'estat de transició de la reacció d'hidròlisi, que va lligat a una estructura planar al voltant dels àtoms C5, O5, C1 i C2. La mitja cadira és una de les conformacions que pot adoptar un anell de piranosa que aconsegueix amb aquest requeriment de planaritat, i s'ha postulat que és una de les possibles conformacions adoptades a l'estat de transició per a la hidròlisi de glicòsids. Els glicals, des del punt de vista estructural, són enol èters 1,2-insaturats derivats de sucres, que adopten una conformació de mitja cadira (figura 3.1). Aquesta semblança estructural amb l'estat de transició, junt amb les primeres determinacions de constants d'inhibició en el rang de micromolar per al D-galactal en el cas de diverses β -galactosidases de diferents orígens [296], van portar a proposar que aquests compostos es comportaven com inhibidors anàlegs a l'estat de transició.

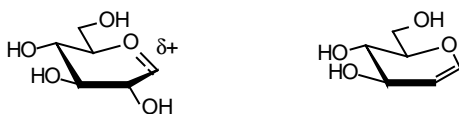


Figura 3.1. Estructures adoptades per un estat de transició oxocarbocatiònic d'una glucosidasa en conformació de mitja cadira (esquerra), i pel glucal (dreta).

Tanmateix, en aprofundir en l'estudi d'aquesta inhibició es va comprovar que la constant de dissociació del D-galactal per part de la β -galactosidasa d'*Escherichia coli* és molt feble amb un valor superior a 10 mM, i que el que realment succeeix, és que l'enzim actua sobre el D-galactal com si fos un pseudosubstrat i l'hidrata per tal de rendir la 2-desoxigalactosa (figura 3.2). Després d'una etapa d'unió feble enzim-inhibidor, el doble enllaç del D-galactal és protonat per l'enzim i es forma un intermedi covalent glicosil-enzim, que en una segona etapa catalítica s'hidrolitza, donant lloc a la 2-desoxigalactosa [297, 298]. El fet que l'etapa d'hidròlisi de l'intermedi glicosil-enzim

sigui molt més lenta que l'etapa de protonació del doble enllaç fa que s'acumuli l'intermedi de reacció, provocant d'aquesta manera la disminució corresponent en el valor de la constant d'inhibició aparent respecte de la constant de dissociació del complex (equació 3.1) des del marge de mil·limolar a micromolar.



Figura 3.2. Reacció de la β -galactosidasa d'*Escherichia coli* sobre el D-galactal.

$$K_{I,\text{aparent}} = \frac{K_1}{1 + \frac{k_2}{k_3}} \quad \text{Equació 3.1.}$$

El mateix s'ha observat en el cas d'algunes glicosidases per a les que es van determinar constants d'inhibició per als glicals corresponents en el marge de micromolar [299, 300]. Ara bé, apart d'aquests casos contats, sembla que generalment en la hidratació de glicals per part de glicosidases l'etapa determinant de la velocitat de reacció sol ser la de protonació del doble enllaç, de manera que les constants d'inhibició mesurades solen reflectir les constants d'inhibició reals.

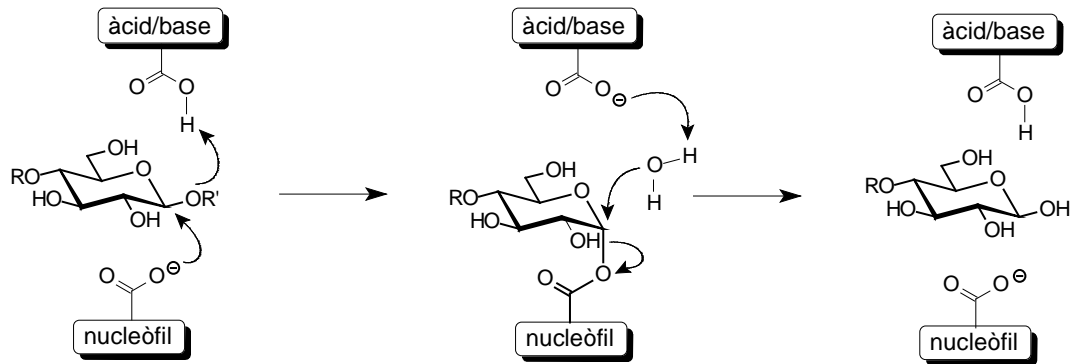
En contra del que s'havia esperat dels glicals, la majoria de constants d'inhibició mesurades estan en el rang de mil·limolar, i el seu comportament, independentment de si són o no hidratats, es descriu millor com el d'un inhibidor competitiu anàleg al substrat. Per tal d'explicar aquest comportament es proposen dues explicacions que poden ser complementàries. D'una banda, la planaritat en els glicals és dóna entre els àtoms O5, C1, C2 i C3, a diferència del que passa a l'estat de transició, en què el pla està definit pels àtoms C5, O5, C1 i C2, de manera que la conformació adoptada no és ben bé la mateixa. De l'altra, els glicals no tenen el substituent a C2 que s'ha demostrat que, en el cas de les β -glicosidases que actuen amb retenció de configuració i inclús en el cas d'alguna α -glicosidasa, estableix amb l'enzim una interacció clau per a l'estabilització de l'estat de transició, amb una contribució energètica que pot arribar a ser de 8 kcal·mol⁻¹ [301] (veure el capítol 4). Per tal d'estudiar l'efecte de l'hidroxil a C2 s'hauria d'introduir aquest substituent a l'estructura del glical; aquest compost enòlic, però, es transforma ràpidament en el tautòmer ceto, que descompon amb molta facilitat. Tot i així, s'ha pogut determinar l'efecte d'aquest substituent en el cas de tres *N*-acetil-hexosaminidases (la de placenta humana, la de *jack bean* i la de ronyó boví), en què es comprova que la incorporació d'un grup *N*-acetil a C2 converteix els glicals en bons inhibidors amb millores d'afinitat superiors a 10³ vegades respecte del corresponent glical sense grup *N*-acetil [302], i que es tradueixen en una contribució energètica a l'estabilització de l'estat de transició de 4.2 kcal·mol⁻¹, atribuïda en la seva totalitat a aquest grup. Tot i que aquests compostos també són hidratats, s'ha comprovat que la millora en afinitat és realment deguda a la interacció enzim-inhibidor, i no és una conseqüència de la reacció d'hidratació. Es comprova d'aquesta manera que els glicals convenientment substituïts a C2 es comporten com inhibidors anàlegs a l'estat de transició.

3.2. Hidratació de glicals per part de glicosidases

En la majoria dels casos, els glicals es constitueixen com una família de pseudosubstrats de glicosidases, que els transformen químicament als corresponents 2-desoxiglicòsids (per a un recull d'exemples veure [301]). Es proposa que aquests compostos s'uneixen al centre actiu de l'enzim de la mateixa manera que ho fa el substrat natural de l'enzim, situant la unitat de piranosa que presenta el doble enllaç al subjeti -1, i amb la mateixa orientació respecte dels grups catalítics [299]. Tot i així, hi ha alguns casos en què el glical no és transformat [297, 300, 303], i en aquests casos s'argumenta que la interacció amb el substituent a C2 del substrat natural deu ser molt important, i la seva substitució o canvi per un altre substituent, no permeten dur a terme la reacció. En els altres casos el seguiment de la reacció per ^1H -RMN en medi deuterat ha permès detectar l'estereoquímica de la reacció. S'ha comprovat que, per a la majoria de glicosidases que hidrolitzen els seus substrats naturals amb retenció de configuració, la protonació inicial del doble enllaç en el cas dels glicals corresponents, es dona pel semiespai oposat a la protonació de l'oxigen glicosídic en la reacció d'hidròlisi (figura 3.3). Això s'ha comprovat en el cas de l' α -glucosidasa del llevat *Candida tropicalis* i la β -glucosidasa d'ametlla dolça [299], la β -galactosidasa d'*Escherichia coli* [298, 304], les α -glucosidases d'*Aspergillus niger*, de sèrum porcí, d'arròs, de fajol i de llavor de remolatxa de sucre [300], la cel·lobiohidrolasa 7A de *Trichoderma reesei* [305], l'exocel·lulasa d'*Irpex lacteus* i l'endocel·lulasa d'*Aspergillus niger* [306]. Aquest fet s'interpreta com un canvi d'actuació del residu catalític que fa el paper de nucleòfil en la reacció d'hidròlisi de substrats, que passa a actuar com a àcid en la reacció d'hidratació de glicals. Tanmateix, no totes les glicosidases que actuen amb retenció de configuració i que protonen els glicals corresponents, ho fan pel semiespai oposat a la protonació de l'oxigen glicosídic en la reacció d'hidròlisi, i per exemple, en el cas de l' α -galactosidasa del gra de cafè [307] i de tres β -N-hexosaminidases, com són la de placenta humana, la de *jack bean* i la de ronyó boví [302], es considera que el mateix residu que actua com a àcid/base en la reacció d'hidròlisi exerceix la protonació del doble enllaç del glical. Independentment del residu catalític que actua en la primera etapa de reacció, en tots els casos en què s'ha pogut determinar l'estereoquímica creada en la hidratació de glicals, s'ha observat que el producte final presenta la mateixa estereoquímica que els productes de la reacció d'hidròlisi. És a dir, si bé el paper del residu que en una primera etapa protona el substrat depèn de la naturalesa del glicòsid sobre el que actua, l'atac a l'intermedi de reacció, que és el mateix que s'obté en la hidròlisi dels anàlegs 2-desoxiglicòsids del substrat [308-310], es dona sempre per la mateixa banda, rendint la mateixa estereoquímica en el producte de reacció independentment del tipus de substrat.

Aquesta dualitat de mecanismes en funció del tipus de substrat sobre el que actua l'enzim fa plantejar la flexibilitat funcional dels residus catalítics [311] i, en definitiva, posa en dubte la rigidesa mecanística dels enzims [306, 312]. Es proposa que en el mecanisme catalític de les glicosidases hi ha una primera fase flexible o plàstica, en què el paper funcional dels residus catalítics està lligat a l'estructura del substrat, i una segona fase conservativa, que està dictada per l'estructura del centre actiu, i que marca la direcció d'aproximació del nucleòfil que ataca l'intermedi de reacció, definint d'aquesta manera l'estereoquímica del producte de reacció [300].

Hidròlisi de substrats per una β -glicosidasa que actua amb retenció de configuració



Hidratació de glicals per una β -glicosidasa que actua amb retenció de configuració

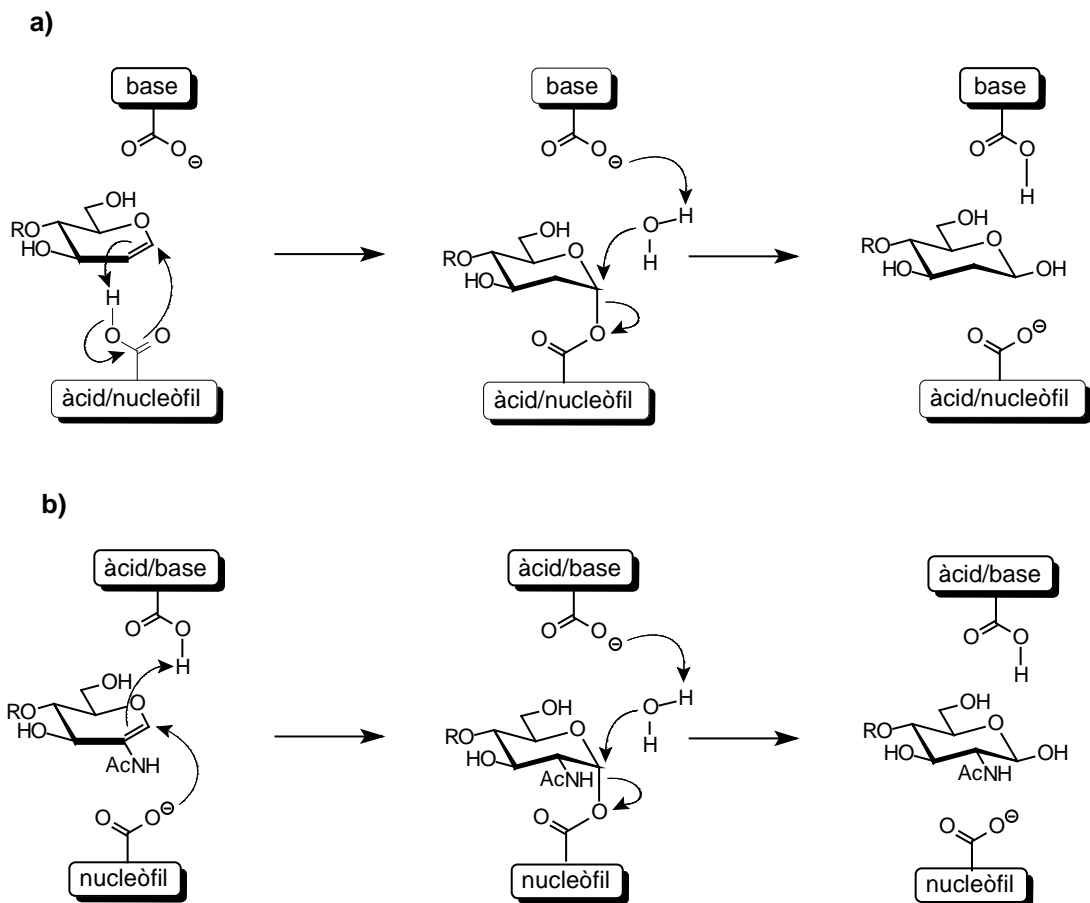


Figura 3.3. Mecanismes de la reacció d'hidròlisi de substrat i d'hidratació de glicals per a una glicosidasa que actua amb retenció de configuració. Per a la reacció d'hidratació de glicals s'han proposat dos mecanismes diferents en funció de si el residu que protona el doble enllaç en la primera etapa de reacció és el mateix que protona l'oxigen glicosídic en la reacció d'hidròlisi (mecanisme **b**) [302] o si la protonació es dona pel semiespai contrari (mecanisme **a**) [301].

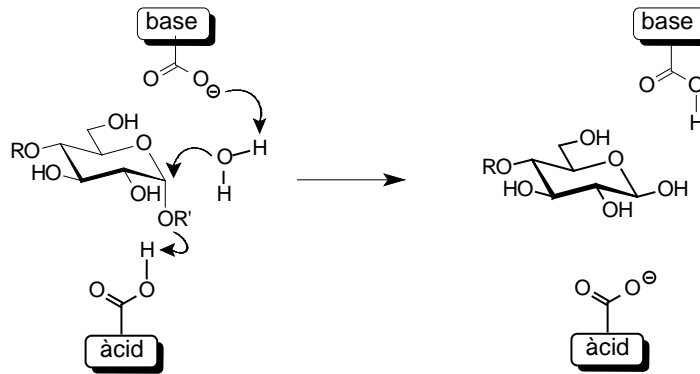
Per tal d'explicar el canvi de papers observat en la primera etapa en la reacció d'hidratació de glicals respecte de la reacció d'hidròlisi, s'argumenta que en unir-se a l'enzim el glical queda més proper al residu que generalment actua com a nucleòfil, que no pas al residu que actua com a àcid general, que en aquest cas es troba massa lluny del doble enllaç per tal de poder exercir la seva protonació. A més, l'estructura del glical és més hidrofòbica que no la del substrat natural, de manera que a les proximitats del nucleòfil es genera un microentorn més hidrofòbic en unir un glical que en unir un glicòsid, i aquest fet seria el causant de l'augment de pK_a d'aquest residu, que el permetria actuar com a residu àcid per a la protonació del doble enllaç del glical [299].

Només s'han observat dos casos en què una glicosidasa que actua amb retenció de configuració protona el doble enllaç del glical amb el mateix residu que protona l'oxigen de l'enllaç a escindir en treballar sobre *O*-glicòsids. Per a l' α -galactosidasa de gra de cafè no es planteja el motiu pel qual la hidratació del D-galactal se surt del comportament general, i directament s'assumeix que el pseudosubstrat deu ocupar un posicionament diferent al centre actiu de l'enzim [307]. En el cas de les β -*N*-hexosaminidases que actuen sobre el 2-*N*-acetilglucal, s'indica clarament que és el posicionament del mateix al centre actiu, el que explica la seva protonació per la banda superior [302]. D'una banda, si la protonació es donés pel semiespai inferior, el substituent *N*-acetil a C2 quedaria en una orientació axial desfavorable. D'altra banda, el fet de ser protonat per la banda superior, permet al grup a C2 realitzar les interaccions pertinents amb l'enzim per tal d'assistir tant la formació com la conseqüent hidròlisi de l'intermedi de reacció.

En el cas de glicosidases que actuen sobre el seus substrats naturals amb inversió de la configuració del carboni anomèric s'ha observat una situació similar. Hi ha casos en què les glicosidases protonen el doble enllaç del glical amb el mateix residu que protona l'oxigen interglicosídic en la reacció d'hidròlisi, com s'ha observat per a la glucodextranasa d'*Arthrobacter globiformis* i les glucoamilases de *Rhizopus niveus* i *Paecilomyces varioti* [300]; i d'altres en què la protonació es duu a terme pel residu que actua com a base a la reacció d'hidròlisi de substrat, com és el cas de les β -amilases de llavor de soja i moniato [312, 313], i la cel·lobiohidrolasa 6A de *Trichoderma reesei* [305]. Tot i així, i a l'igual que passa amb les glicosidases que actuen amb retenció de configuració, en aquells casos que s'ha pogut determinar, l'estereoquímica del producte de reacció és la mateixa en la reacció d'hidratació de glicals que en la hidròlisi de substrats. El plantejament proposat és per tant, el mateix. Es dona una primera fase plàstica marcada per la naturalesa del substrat i el seu posicionament al centre actiu, i una segona fase conservativa controlada per l'estructura del centre actiu de l'enzim, que és la que defineix l'estereoquímica del producte de reacció.

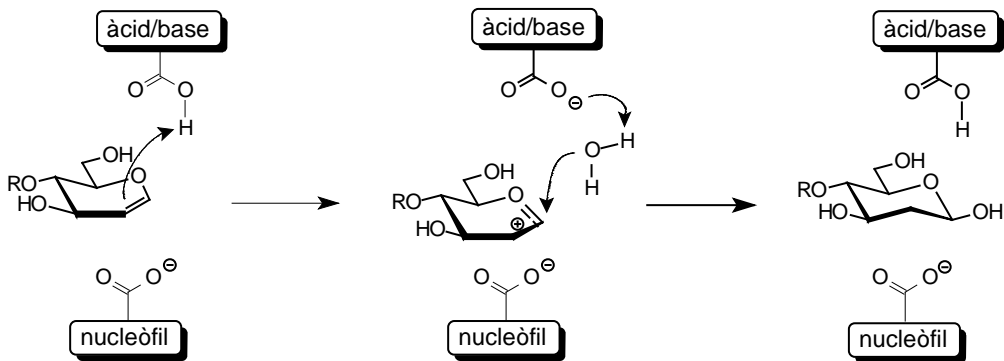
Els diferents mecanismes per a la hidròlisi de substrat i la hidratació de glicals proposats per a una glicosidasa que actua amb inversió de configuració es mostren a la figura 3.4. Val la pena remarcar que en el cas que la protonació del glical es doni pel semiespai oposat al de la hidròlisi del substrat, el mecanisme de reacció passa a ser de dues etapes, ja que el mateix residu que actua com a àcid a la primera etapa fa de base a la segona.

Hidròlisi de substrats per una α -glicosidasa que actua amb inversió de configuració



Hidratació de glicals per una α -glicosidasa que actua amb inversió de configuració

a)



b)

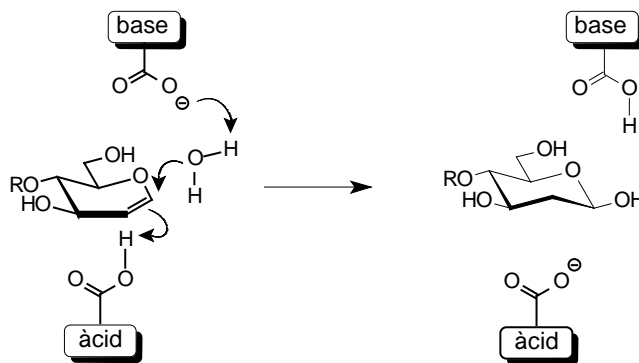


Figura 3.4. Mecanismes de la reacció d'hidròlisi de substrat i d'hidratació de glicals per a una glicosidasa que actua amb inversió de configuració. Per a la reacció d'hidratació de glicals s'han proposat dos mecanismes diferents en funció de si el residu que protona el doble enllaç és el mateix que protona l'oxigen glicosídic en la reacció d'hidròlisi (mecanisme **b**) o si la protonació es dona pel semiespai contrari (mecanisme **a**) [312].

Finalment, només queda constatar una darrera semblança entre la reacció d'hidròlisi de substrats i la d'hidratació de glicals, en el fet que totes dues reaccions són susceptibles d'inhibició [299, 300] o bé d'activació per excés de substrat [300], i inclús en algun cas s'ha observat la presència de productes de transglicosidació en la reacció amb glicals [306].

3.3. Antecedents amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

En treballs anteriors realitzats al Laboratori de Bioquímica s'ha estudiat l'acció de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* sobre dos glicals diferents, l'*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-1,5-anhidro-2-desoxi-D-*arabino*-hex-1-enitol, (G4G4G', on G' representa una unitat de 1,5-anhidro-2-desoxi-D-*arabino*-hex-1-enitol) i l'*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-1,5-anhidro-2-desoxi-D-*arabino*-hex-1-enitol (G4G3G', **56**). Quan aquests dos glicals són assajats com a inhibidors de la hidròlisi del substrat G4G3G-MU per part de la β -glucanasa, i es comparen les constants d'inhibició obtingudes amb les dels glicòsids anàlegs, G4G4G i G4G3G es comprova que tots quatre es comporten com inhibidors competitiu, amb constants d'inhibició en el marge del mil·limolar (figura 3.5) [223].

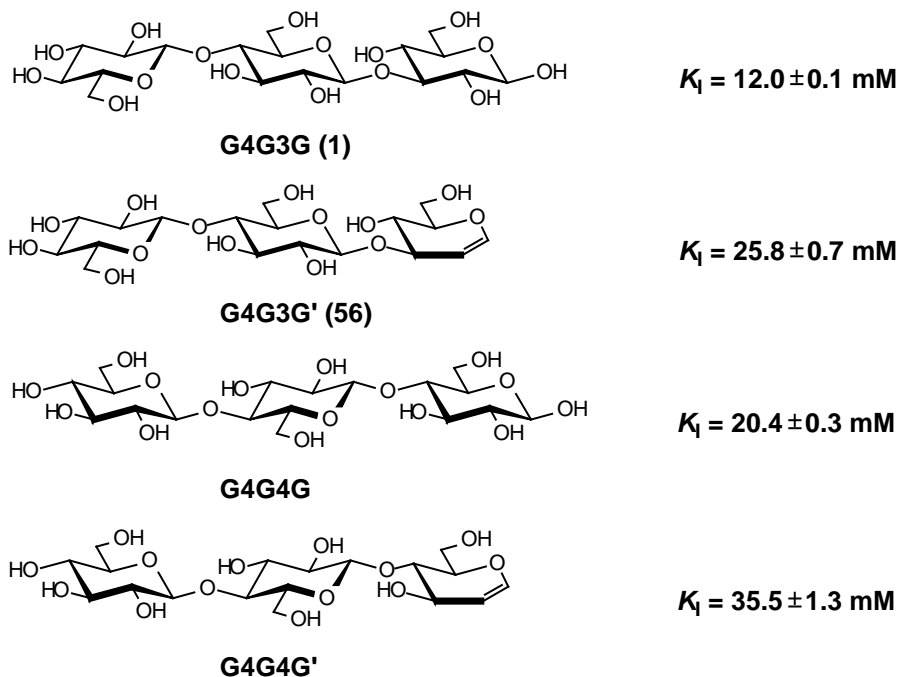


Figura 3.5. Estructura de quatre trisacàrids assajats com inhibidors de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* i constants d'inhibició associades a cadascun d'ells. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl_2 , pH 7.2, 55 °C [223]. G': 1,5-anhidro-2-desoxi-D-*arabino*-hex-1-enitol.

Les constants d'inhibició dels glicals són superiors a les dels glicòsids anàlegs indicant que la pèrdua dels substituents a C1 i C2 pot ser important en la unió d'aquests compostos a la β -glucanasa. D'altra banda, s'observa que per als dos trisacàrids que no

disposen d'enllaç β -1,3 les constants d'inhibició són superiors a les dels altres dos, indicant un millor posicionament d'aquests darrers al centre actiu de l'enzim.

Es comprova també que la β -glucanasa només és capaç d'hidratar el G4G3G', que és l'únic que presenta l'estructura bàsica per tal de ser reconegut com a substrat [223]. En aquesta reacció s'observa que la protonació del doble enllaç es dona per la cara inferior del sucre, és a dir en el sentit invers a la reacció d'hidròlisi d'*O*- β -D-glicòsids, i que s'obté el 2-desoxiglicòsid **69** amb l'estereoquímica β -esperada (figura 3.6). Aquests resultats suggereixen un canvi del paper exercit pels residus catalítics durant la primera etapa de reacció, que s'ha descrit que va lligat a un canvi en el seu pK_a microscòpic.

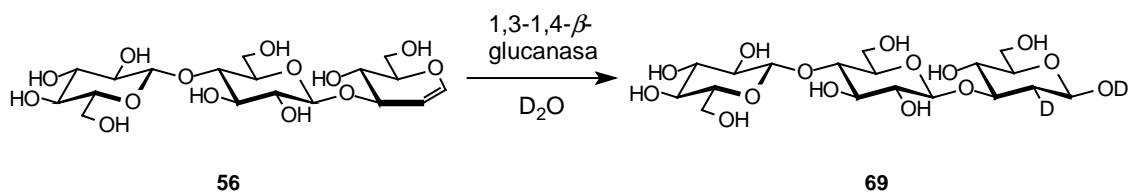


Figura 3.6. Reacció d'hidratació del glical G4G3G' (**56**) per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, que rendeix el 2-desoxiglicòsid **69**.

Malgrat la proposta de plasticitat en el paper exercit pels residus catalítics, no s'han realitzat estudis sistemàtics per tal d'avaluar el seu canvi de pK_a en unir els glicals. Només s'ha descrit un perfil de pH de la reacció d'hidratació de glicals en el cas de la hidratació del glucal per part de la β -glucosidasa d'*Aspergillus wentii* [308], però ni tan sols en aquest cas es va poder avaluar el canvi de pK_a per la dificultat que van trobar en determinar acuradament els valors de k_{cat} als diferents pH. Així doncs, i tot i que l'explicació del canvi de pK_a del residu que generalment actua com a nucleòfil/base de manera passa a actuar com a àcid general és la més lògica i comunament acceptada, no hi ha constància d'aquest canvi de pK_a en el cas de cap glicosidasa en la que s'observi aquesta dualitat d'actuació. Aquest fet és el que motiva l'estudi cinètic de la hidratació enzimàtica del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, i la seva dependència amb el pH.

3.4. Requeriments

Amb la finalitat d'estudiar la cinètica de la reacció d'hidratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* i realitzar un perfil de pH és necessari disposar de l'enzim salvatge en quantitats de mg i, donada l'elevada constant d'inhibició observada per al G4G3G' ($K_I = 25.8$ mM [223]), de gran quantitat de glical. Al capítol de síntesi de substrats s'exposa el treball realitzat per tal d'obtenir aquest compost, i al capítol d'expressió i purificació enzimàtica s'indica el procediment seguit per a l'obtenció de l'enzim amb la puresa adequada per a l'estudi cinètic.

L'altre repte per tal d'obtenir uns resultats reproduïbles i representatius de la cinètica enzimàtica és el de trobar un bon mètode de seguiment de la velocitat de reacció d'hidratació del glical. Les proves realitzades es recullen a la part experimental (apartat III.4). Finalment s'ha decidit realitzar el seguiment de la velocitat de reacció per HPLC a través de l'estudi de la desaparició del glical G4G3G' (**56**) amb un detector d'índex de refracció. Així, la reacció procedeix a la temperatura desitjada (30 °C) dins dels

mateixos vials emprats en la posterior anàlisi cromatogràfica i a diferents temps s'avalua el progrés de la reacció per injecció d'una alíquota de reacció al cromatògraf. Per tal d'independitzar els resultats de possibles variacions en el volum d'injecció s'ha utilitzat el metil α -D-glucopiranosid com a patró d'injecció. A les condicions escollides per a l'anàlisi, el pic corresponent al metil α -D-glucopiranosid apareix a un temps de retenció de 4.6 minuts, el del glical **56** a 6.1 minuts i el del 2-desoxiglicòsid **69** a 7.7 minuts, sent la durada total del cromatograma de 10 minuts (figura 3.7).

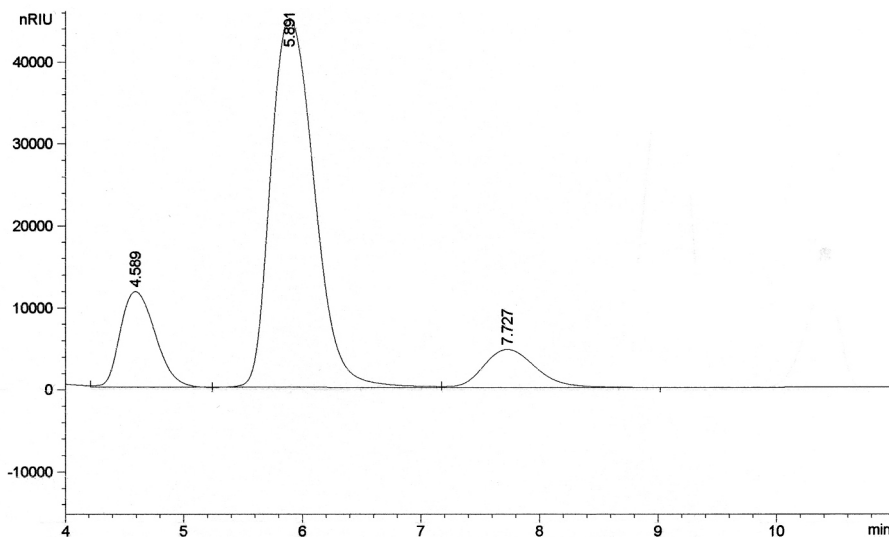


Figura 3.7. Cromatograma obtingut en l'avaluació del progrés de la hidratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en el que es mostren els pics corresponents al G- α -O-Me, el glical G4G3G' i el 2-desoxiglicòsid **69**.

3.5. Determinació de la cinètica d'hidratació del glical G4G3G' per part de l'enzim salvatge i mutants en residus essencials del centre actiu de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Hidratació enzimàtica

Dins de l'estudi de la reacció d'hidratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* el primer que es comprova és que durant el temps de seguiment de la reacció no es detecta cap altre producte tret del 2-desoxiglicòsid **69**. A més, s'observa que la disminució de l'àrea del pic del glical al llarg del temps es correspon amb el creixement de l'àrea del pic corresponent al producte d'hidratació **69**. Per tal d'assegurar que el 2-desoxiglicòsid format respon únicament a l'actuació de la 1,3-1,4- β -glucanasa sobre el glical de partida, es realitzen una sèrie de reaccions d'hidratació del glical G4G3G', en què l'únic que es varia és la concentració d'enzim. Tal i com era d'esperar, s'observa que la velocitat d'hidratació del glical G4G3G' presenta una relació lineal amb la concentració de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (figura 3.8), fet indicatiu que la reacció que s'estudia transcorre per catàlisi enzimàtica.

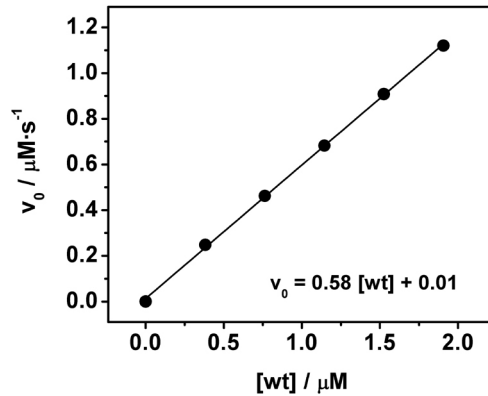


Figura 3.8. Relació entre la velocitat d'hydratació del glical G4G3G' i la concentració d'enzim salvatge de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*. En el gràfic es representa la velocitat d'hydratació inicial en μM de glical transformat·s⁻¹ respecte de la concentració d'enzim salvatge en μM. Condicions de reacció: tampó 5.5 mM fosfat, 5.5 mM citrat, pH 6.98, 0.1 mM CaCl₂ a 30 °C, i una concentració de G4G3G' de 25 mM.

Importància dels carboxilats Glu134, Asp136 i Glu138 en la hidratació del glical G4G3G'

Es realitza un estudi comparatiu de les velocitats de reacció tant de l'enzim salvatge, com dels mutants inactius en els tres residus àcids situats a les proximitats del subseiti -1, els glutamats 134 i 138 i l'aspartat 136, per tal d'avaluar la importància relativa dels tres en la reacció d'hydratació. Els glutamats 134 i 138, que són els residus que actuen com a nucleòfil i àcid/base general, respectivament, en la reacció d'hydròlisi de substrat; haurien d'actuar com a àcid general i base general, respectivament, en la reacció d'hydratació del glical G4G3G'. A més, s'ha plantejat que l'aspartat 136, que és el residu que es proposa que participa en el correcte posicionament dels residus catalítics i en la definició dels seus pK_a en la reacció d'hydròlisi del substrat, pugui tenir un paper més rellevant en la reacció d'hydratació de glicals. Així, s'ha proposat que aquest residu, que es troba en una posició intermèdia entre els dos residus catalítics, pugui exercir un paper actiu en la transferència de protó des del Glu138 al Glu134 un cop unit el glical, de manera que el Glu134 es trobi en l'estat de protonació apropiat per tal d'actuar com a àcid a la primera etapa de reacció, i el Glu138 com a base en la segona etapa de reacció, i es conservi el balanç protònic propi de l'enzim (figura 3.9) [223]. De no ser així, el protó incorporat pel Glu134 provindria d'una molècula d'aigua, sense constància de com quedaria el balanç protònic de l'enzim.

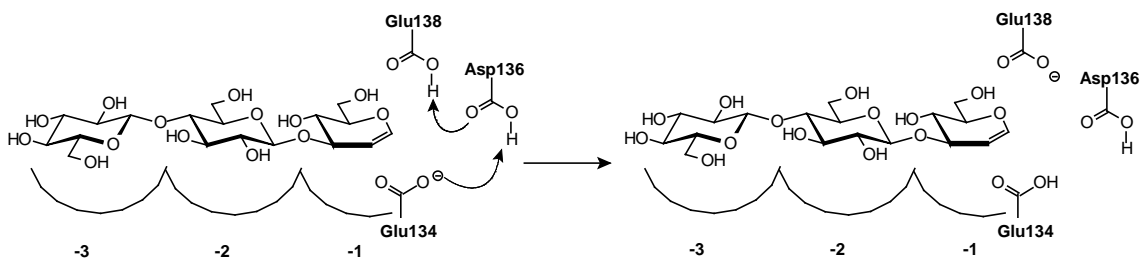


Figura 3.9. Paper del residu Asp136 en la transferència de protó que es proposa que té lloc en la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* en unir el glical [223].

Les cinètiques es realitzen en tampó 5.5 mM fosfat, 5.5 mM citrat, pH 6.98, 0.1 mM de CaCl_2 a 30 °C, i una única concentració de G4G3G' saturant, de 28 mM. La concentració d'enzim salvatge és de 1.5 μM , mentre que la concentració dels tres mutants inactius E138A, E134A i D136A és aproximadament 10 vegades superior. En aquestes condicions de reacció s'ha comprovat que la velocitat d'hidratació del glical G4G3G' de l'enzim salvatge és de 0.53 s^{-1} , sent la velocitat del mutant E138A un 0.3% de la mateixa. En els casos dels mutants E134A i D136A, després de 50 hores de reacció no s'ha observat hidratació del glical més enllà de la que es dona de forma espontània. A la taula 3.1 es dona per a aquests dos mutants un valor màxim per a la velocitat d'hidratació del glical **56** a partir del límit de quantificació del mètode. En aquesta taula es resumeixen els resultats obtinguts per aquests quatre enzims en la reacció d'hidratació del glical G4G3G', i s'inclouen també els resultats obtinguts pels mateixos enzims en la hidròlisi del substrat G4G3G-MU a nivell comparatiu.

Taula 3.1. Resultats obtinguts per a la hidratació del glical G4G3G' i en la hidròlisi del substrat G4G3G-MU per part de l'enzim salvatge i els mutants E134A, D136A i E138A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Condicions de reacció per a la hidratació: tampó 5.5 mM citrat, 5.5 mM fosfat, pH 6.98, 0.1 mM CaCl_2 , 30 °C, $[\text{G4G3G}'] = 28 \text{ mM}$, $[\text{wt}] = 1.53 \mu\text{M}$, $[\text{E134A}] = 17.7 \mu\text{M}$, $[\text{D136A}] = 13.9 \mu\text{M}$, $[\text{E138A}] = 15.39 \mu\text{M}$. Condicions de la reacció d'hidròlisi: tampó citrat/fosfat (6.5 mM citrat, 87 mM fosfat) pH 7.2, 0.1 mM CaCl_2 , 30 °C.

	Hidratació G4G3G'		Hidròlisi G4G3G-MU	
	$v_0/[\text{E}]_0$ (a $[\text{G4G3G}'] = 28 \text{ mM}$) / s^{-1}	% activitat	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	% activitat
wt	0.53 ± 0.04	100	0.67 ± 0.02 ^(a)	100
E134A	$< 9.4 \cdot 10^{-5}$	< 0.02	$(4 \pm 2) \cdot 10^{-6}$ ^(a)	$6 \cdot 10^{-4}$
D136A	$< 1.2 \cdot 10^{-4}$	< 0.02	$(9.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$ ^(b)	1.5
E138A	$1.74 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-5}$	0.3	$(6.7 \pm 0.4) \cdot 10^{-4}$ ^(a)	0.1

(a) resultats obtinguts per J.L. Viladot [207]; (b) Norbert Furumo, comunicació personal.

En la reacció d'hidròlisi del substrat G4G3G-MU els mutants en els dos residus catalítics són els que presenten una activitat més baixa, mentre que el mutant D136A, que no està implicat directament en catàlisi conserva un 1.5% d'activitat. A la vista d'aquests resultats, era d'esperar una davallada important de l'activitat d'hidratació en el cas dels mutants en els residus catalítics, però sobta el resultat obtingut amb el mutant D136A que dona evidència d'un paper més important d'aquest residu en la reacció d'hidratació del glical G4G3G' que no pas en la reacció d'hidròlisi de substrats, implicant-lo directament en catàlisi. Aquesta podria ser una dada a favor del paper proposat per al residu Asp136 en la transferència interna de protó. També es podria pensar en què aquest residu sigui el que protoni directament el doble enllaç del glical, assumint el paper d'àcid general, de manera que el glutamat 134 en aquesta primera etapa de reacció només actuï com a nucleòfil, i el glutamat 138, més allunyat del centre de reacció, jugui un paper en el manteniment i estabilització de pK_a dels dos residus catalítics.

Cinètica d'hidratació del glical G4G3G'

Les cinètiques d'hidratació es realitzen en tampó 5.5 mM fosfat, 5.5 mM citrat, 0.1 mM CaCl₂, al pH desitjat i a 30 °C. Per tal d'obtenir els paràmetres cinètics corresponents es treballa a varies concentracions de substrat (i patró d'injecció), i a la concentració d'enzim adient. A diferents temps de reacció s'analitza per HPLC una alíquota de la mescla de reacció per tal de poder determinar a cada concentració de glical la velocitat inicial de reacció. A la figura 3.10 es presenten els resultats obtinguts a pH 6.98, on es comprova que els resultats obtinguts no s'ajusten a una cinètica de Michaelis-Menten, sinó que la dependència de la velocitat de reacció amb la concentració de substrat és quadràtica.

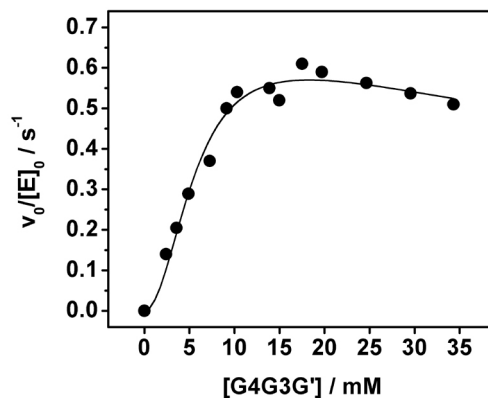


Figura 3.10. Cinètica d'hidratació del glical G4G3G' catalitzada per la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Condicions de reacció: tampó 5.5 mM fosfat, 5.5 mM citrat, 0.1 mM CaCl₂, pH 6.98, 30 °C, [wt] = 0.69 μM.

Aquest comportament generalment es pot explicar en base a un mecanisme d'activació amb dues formes enzimàticament actives com el que es presenta a la figura 3.11, al que a més se li ha afegit una etapa de formació del complex ES₂' que justifica la inhibició acompetitiva per substrat observada.

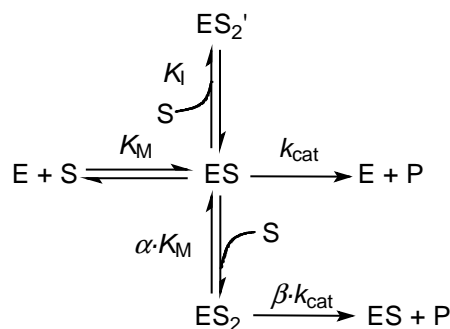
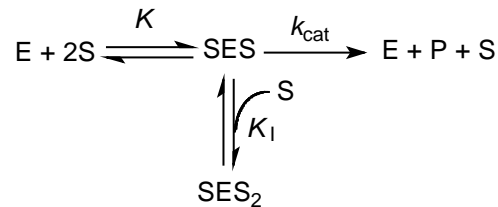


Figura 3.11. Mecanisme d'activació amb dues formes enzimàtiques actives, i una etapa d'inhibició acompetitiva per substrat.

Ara bé, aquest mecanisme és massa complex i amb els resultats de que es disposa no es pot obtenir una bona determinació dels paràmetres cinètics. El mecanisme més simple que millor s'ajusta als resultats obtinguts es mostra a la figura 3.12 i contempla alhora

un comportament d'activació al·lostèrica i d'inhibició acompetitiva per substrat. En aquest mecanisme la K és el producte de les dues constants de dissociació que porten a la formació del complex ternari productiu SES. A la figura 3.12 també es presenta l'equació de velocitat associada a aquest mecanisme i els resultats obtinguts en l'ajust a pH 6.98.



$$\frac{v_0}{[E]_0} = \frac{k_{cat} \cdot [S]^2}{K + [S]^2 + \frac{[S]^3}{K \cdot K_1}} \quad \begin{array}{l} k_{cat} = 0.76 \pm 0.08 \text{ s}^{-1} \\ K = 37 \pm 8 \text{ mM}^2 \\ K_1 = 2.2 \pm 1.4 \text{ mM} \end{array}$$

Figura 3.12. Mecanisme ajustat a les cinètiques d'hydratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, i equació de velocitat associada. S'indiquen els valors dels paràmetres cinètics obtinguts en l'ajust per a la reacció realitzada a pH 6.98.

Velocitat d'hydratació de glicals

Pel que fa a la comparació entre la velocitat d'hydratació de glicals i d'hidròlisi de substrats que han estat descrites es poden definir dos grans grups. Aquelles glicosidases que hidraten els glicals a una velocitat molt inferior a la velocitat d'hidròlisi dels substrats corresponents, com és el cas de les β -glucosidases d'*Agrobacterium faecalis* [303], d'ametlla dolça [299] i d'*Aspergillus wentii* [308], les β -N-acetilhexosaminidases de placenta humana, de *jack bean* i de ronyó boví [302], la β -galactosidasa d'*Escherichia coli* [298], o la cel·lobiohidrolasa Cel6A de *Trichoderma reesei* [305]. I les glicosidases que hidraten els glicals a una velocitat comparable a la d'hidròlisi dels substrats oligosacàrids corresponents, com és el cas de l' α -glucosidasa de *Candida tropicalis* [299], la glucodextranasa d'*Arthrobacter globiformis* i les glucoamilases de *Rhizopus niveus* i *Paecilomyces varioti* [300], o la cel·lobiohidrolasa Cel7A de *Trichoderma reesei* [305].

A més, en aquells casos en què s'ha comprovat, s'observa que la velocitat d'hydratació de glical guarda una correlació amb la velocitat d'hidròlisi de 2-desoxiglicòsids. Aquells enzims que hidraten els glicals a una velocitat molt inferior a la velocitat d'hidròlisi de substrats, hidrolitzen els 2-desoxianàlegs també a una velocitat molt inferior; i aquells enzims per als que l'hidroxil a C2 no sembla jugar un paper rellevant en la velocitat d'hidròlisi de substrat, són els que hidraten els glicals a una velocitat major.

Taula 3.2. Comparació de les velocitats relatives d'hidròlisi de 2-desoxiglicòsids i d'hidratació de glicals respecte de la velocitat d'hidròlisi de glicòsids completament hidroxilats, en diferents glicosidases.

Enzim	$k_{\text{cat}} \text{ 2-desoxiglicòsid} / k_{\text{cat}} \text{ glicòsid}$	$k_{\text{cat}} \text{ hidratació} / k_{\text{cat}} \text{ hidròlisi}$
β -glucosidasa A3 d' <i>Aspergillus wentii</i> ^a	$4.2 \cdot 10^{-6}$	$1.9 \cdot 10^{-6}$
β -galactosidasa d' <i>Escherichia coli</i> ^b	$2.3 \cdot 10^{-6}$	$2.3 \cdot 10^{-6}$
β -glucosidasa <i>Agrobacterium faecalis</i> ^c	$1.8 \cdot 10^{-4}$	$2.7 \cdot 10^{-4}$
α -glucosidasa d'arròs ^d	5.4	$4.8 \cdot 10^{-2}$
α -glucosidasa d' <i>Aspergillus niger</i> ^e	28.2	$1.6 \cdot 10^{-2}$
α -glucosidasa de llevat de flequer ^f	$1.1 \cdot 10^{-4}$	No hidrata glicals
α -glucosidasa de llevat de cervesa ^g	$3.4 \cdot 10^{-4}$	No hidrata glicals
α -glucosidasa de mel d'abella ^h	No hidrolitza 2-desoxiglicòsids	No hidrata glicals

^a Substrats hidròlisi: 4'-metilumbel·liferil β -D-glucopirànòsid; 4'-metilumbel·liferil 2-desoxi- β -D-glucopirànòsid [309]. Substrat d'hidratació: D-glucal [308].

^b Substrats hidròlisi: 2',4'-dinitrofenil β -D-galactopirànòsid. Degut a la labilitat del 2',4'-dinitrofenil 2-desoxi- β -D-galactopirànòsid no arriben a determinar la seva velocitat d'hidròlisi enzimàtica i assimilen la seva k_{cat} a la de la hidratació del D-galactal, ja que l'etapa determinant de la velocitat de reacció d'aquest darrer és la segona. Fent servir com a substrat el 2',4'-dinitrofenil 2-desoxi-2-fluoro- β -D-galactopirànòsid la k_{cat} és de $4.3 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ [31]. Substrat hidratació: D-galactal [298, 314].

^c Substrats hidròlisi: 4'-nitrofenil β -D-glucopirànòsid; 4'-nitrofenil 2-desoxi- β -D-glucopirànòsid [30]. Substrat d'hidratació: D-glucal [303].

^d Substrats hidròlisi: 4'-nitrofenil α -D-glucopirànòsid i 4'-nitrofenil 2-desoxi- α -D-glucopirànòsid [315]. Substrat d'hidratació: D-glucal [300], es compara amb l'activitat d'hidròlisi de maltosa.

^e Substrats hidròlisi: 4'-nitrofenil α -D-glucopirànòsid i 4'-nitrofenil 2-desoxi- α -D-glucopirànòsid [316]. Substrat d'hidratació: D-glucal [300], es compara amb l'activitat d'hidròlisi de maltosa.

^f Substrats hidròlisi: Metil-isomaltòsid i 2'-desoxi-metil- α -isomaltòsid; les dades de velocitat es donen en $V_{\text{max}}/K_{\text{M}}$ ($\text{s}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$) [317]. Substrat d'hidratació: D-glucal [297].

^g Substrats hidròlisi: Metil-isomaltòsid i 2'-desoxi-metil- α -isomaltòsid; les dades de velocitat es donen en $V_{\text{max}}/K_{\text{M}}$ ($\text{s}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$) [317]. Substrat d'hidratació: D-glucal [300].

^h Substrats hidròlisi: 4'-nitrofenil α -D-glucopirànòsid i 4'-nitrofenil 2-desoxi- α -D-glucopirànòsid [316]. Substrat d'hidratació: D-glucal [300].

La 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* forma part d'aquest segon grup d'enzims, ja que la velocitat d'hidratació del glical G4G3G' ($k_{\text{cat}} 0.76 \text{ s}^{-1}$ a pH 6.98) és del mateix ordre de magnitud que la k_{cat} per a la hidròlisi del substrat G4G3G-MU ($k_{\text{cat}} 0.67 \text{ s}^{-1}$ a pH 7.2) o del substrat G4G4G3G-4NP (0.73 s^{-1} a pH 7.2). Tanmateix, no es pot dir que l'eficiència catalítica de la reacció d'hidratació del glical G4G3G' sigui del mateix ordre de magnitud que la de la reacció d'hidròlisi de substrats, donat que la concentració de substrat a la que s'assoleix la velocitat màxima en la reacció d'hidratació és molt superior que no pas per a la reacció d'hidròlisi. O dit d'una altra manera, l'afinitat per substrat de la 1,3-1,4- β -glucanasa és molt superior en el cas de la reacció d'hidròlisi, que no pas en la reacció d'hidratació de glicals.

3.6. Perfil de pH de la reacció d'hidratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

3.6.1. Dependència de l'activitat enzimàtica amb el pH

De la dependència de l'activitat enzimàtica enfront del pH es poden obtenir els pK_a cinètics de l'enzim, que habitualment s'atribueixen als residus catalítics. Generalment, en un mecanisme de Michaelis-Menten la informació obtinguda fa referència al complex enzim-substrat si s'estudia la variació del paràmetre k_{cat} en funció del pH, o a l'enzim lliure si la dependència del pH s'estableix a partir del paràmetre k_{cat}/K_M . En el mecanisme proposat per a la hidratació del glical, el paràmetre k_{cat} fa referència al complex productiu SES, i el paràmetre k_{cat}/K a l'enzim lliure. Ara bé, per a la correcta assignació de pK_a obtinguts d'aquesta manera a un residu en concret, s'ha de verificar el pK_a del mateix per un mètode alternatiu independent, com poden ser, la valoració dels pK_a per RMN [117, 318, 319], l'espectre diferencial de fluorescència o d'absorbància de triptòfans propers a un grup ionitzable [320], o la dependència del grau d'inactivació enzimàtica amb el pH [206, 321, 322].

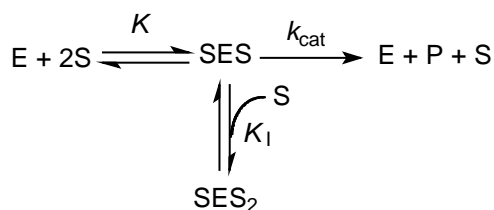
En el model aplicat a aquest tipus d'estudi s'assumeix que, si bé diferents formes enzimàtiques amb diferents estats de ionització poden unir substrat, només una d'elles, en què el nucleòfil es troba ionitzat i el residu que actua com a àcid es troba en la seva forma neutra, és activa, i per tant l'activitat enzimàtica és directament proporcional a la seva concentració. Apart d'aquesta primera simplificació, que generalment és certa, s'han de realitzar una sèrie d'assumpcions que permeten fer el tractament de dades més senzill: els grups s'han de comportar com àcids o bases perfectament valorables, les diferents formes enzimàtiques i intermedis de reacció estan en equilibri protònic (és a dir, les etapes de protonació no són determinants de la velocitat de reacció, perquè són més ràpides que no les etapes químiques), i no hi ha canvi d'etapa determinant de la velocitat de reacció durant el marge de pH estudiat. A més de totes aquestes simplificacions s'ha de comprovar que l'enzim sigui estable al llarg de tot el marge de pH estudiat.

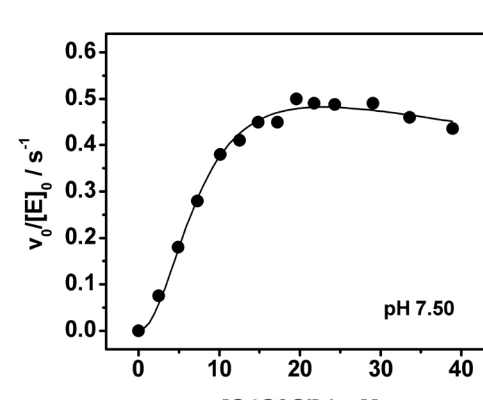
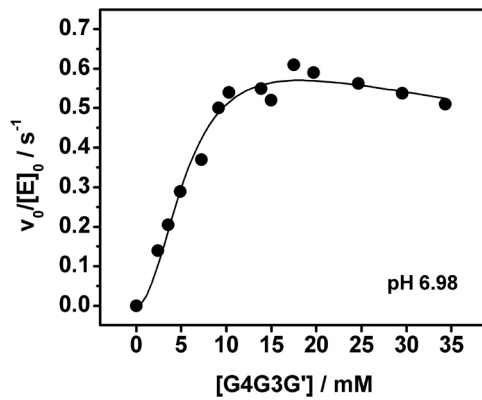
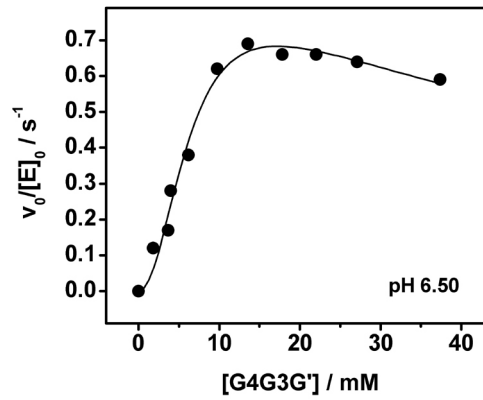
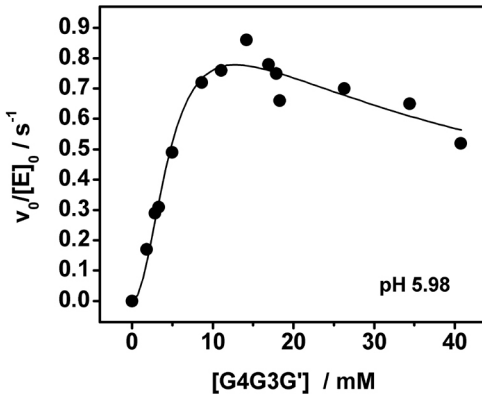
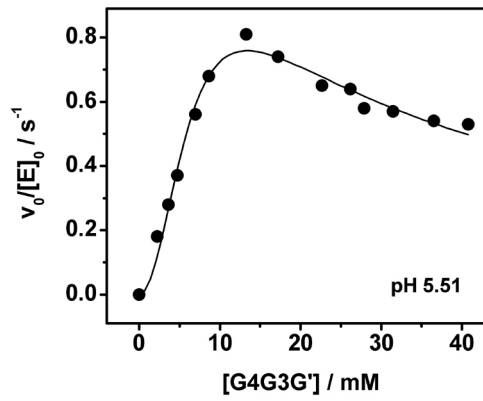
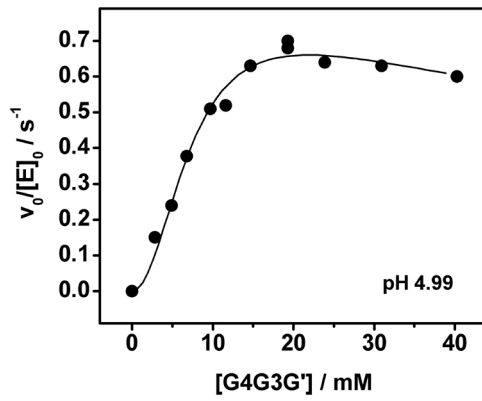
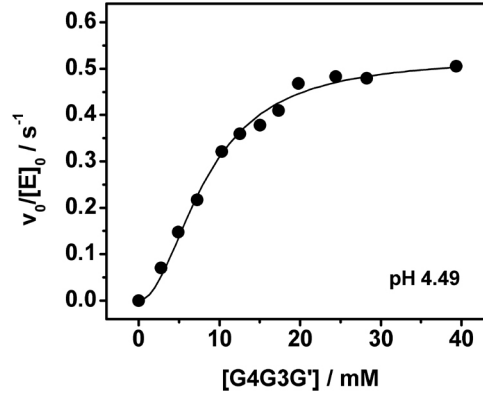
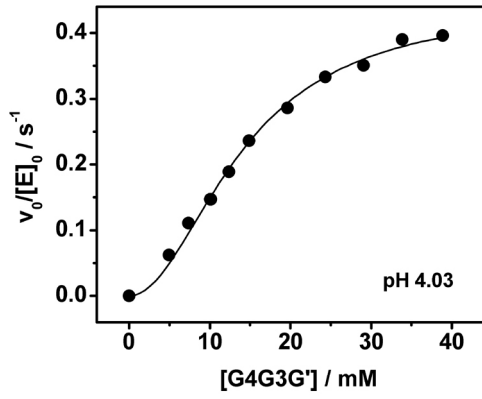
3.6.2. Perfil de pH per a la hidratació enzimàtica del glical G4G3G'

Amb la finalitat de determinar els pK_a dels residus catalítics i comprovar si es dona el canvi de pK_a proposat per al Glu134 en unir el glical, es realitzen una sèrie de cinètiques a diferents concentracions de glical cobrint un marge de pH des de 4.0 a 8.6. La comparació dels valors de pK_a obtinguts a partir dels perfils de pH dels paràmetres cinètics corresponents hauria de permetre observar el canvi en formar-se el complex enzim-substrat productiu. Ara bé, donat que el terme k_{cat} aporta informació sobre les dues etapes catalítiques, l'etapa determinant de la velocitat de reacció ha de ser l'etapa de protonació del glical per tal d'obtenir informació sobre el complex SES. Si per contra, la segona etapa de reacció fos l'etapa determinant de la velocitat de reacció el paràmetre k_{cat} donaria informació sobre l'intermedi de reacció. En el cas de la hidratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* hi ha dos tipus de resultats que indiquen que la primera etapa és l'etapa determinant de la

velocitat de reacció. D'una banda, el fet que el valor de la constant d'inhibició d'aquest glical sigui de l'ordre dels mM i superior a la del glicòsid G4G3G (sobre el que la 1,3-1,4- β -glucanasa no mostra cap tipus de reacció), indica que es tracta d'una constant de dissociació real, i que molt possiblement no hi ha acumulació de l'intermedi de reacció. D'altra banda, s'ha de tenir present que la segona etapa en la reacció d'hidratació del glical G4G3G' i en la reacció d'hidròlisi del 2-desoxitrisacàrid (G4G3(2dG)-4NP) és la mateixa, ja que totes dues etapes parteixen del mateix intermedi covalent glicosil-enzim. En el capítol 4 de la present tesi es comprova que la hidròlisi de 2-desoxisubstrats per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa és més ràpida que no pas la de substrats en què no s'ha substituït l'hidroxil a C2. Així doncs, donat que la velocitat de reacció en estat estacionari reflecteix la velocitat de l'etapa més lenta, el valor de la k_{cat} per a la hidròlisi de 2-desoxisubstrats reflecteix un valor mínim per a la segona etapa tant de la hidratació de glicals com de la hidròlisi de 2-desoxisucres, i donat que la velocitat d'hidratació de glicals a concentració de substrat saturant és de l'ordre de la k_{cat} per al G4G4G3G-4NP i inferior a la del G4G4G3(2dG)-4NP, es dedueix que l'etapa de protonació del glical és l'etapa determinant de la velocitat de reacció. En aquest punt cal esmentar que mentre que l'estudi amb 2-desoxiglicòsids s'ha realitzat amb un tetrasacàrid, l'estudi d'hidratació de glicals s'ha realitzat amb un trisacàrid. Per tant aquest raonament només és aplicable si la velocitat d'hidratació d'un glical tetrasacàrid G4G4G3G' és similar a l'obtinguda amb el glical G4G3G'; així i tot aquest plantejament es pot donar per bó, ja que s'ha demostrat que per a la reacció d'hidròlisi el subseti més important en l'eficiència catalítica de l'enzim és el subseti -3 i no el -4, i els valors obtinguts en la hidròlisi d'un trisacàrid i un tetrasacàrid de la mateixa família són del mateix ordre de magnitud.

Les cinètiques es realitzen en tampó 5.5 mM fòsfat, 5.5 mM citrat, amb 0.1 mM CaCl₂, a 30 °C, a la concentració adient d'enzim en cada cas, a varies concentracions de substrat i patró d'injecció, i als diversos pH escollits. A diferents temps de reacció s'analitza per HPLC una alíquota de la mescla de reacció per tal de poder determinar a cada concentració de glical la velocitat inicial de reacció. Les cinètiques són lineals per a tots els pH i concentracions de glical emprades. A cadascun dels pH de treball s'ha realitzat també una determinació de la hidratació espontània de glical, verificant que aquesta no és significativa en cap cas enfront de la hidratació enzimàtica. Els resultats s'ajusten al model de la figura 3.12 (que es torna a mostrar a continuació) rendint els valors cinètics que es recullen a la taula 3.3. Els ajusts als diferents pH es mostren a la figura 3.13. Els resultats obtinguts a pH 8.62 són els que presenten una dependència amb la concentració de glical més complexa, i com a conseqüència presenten pitjors ajusts.





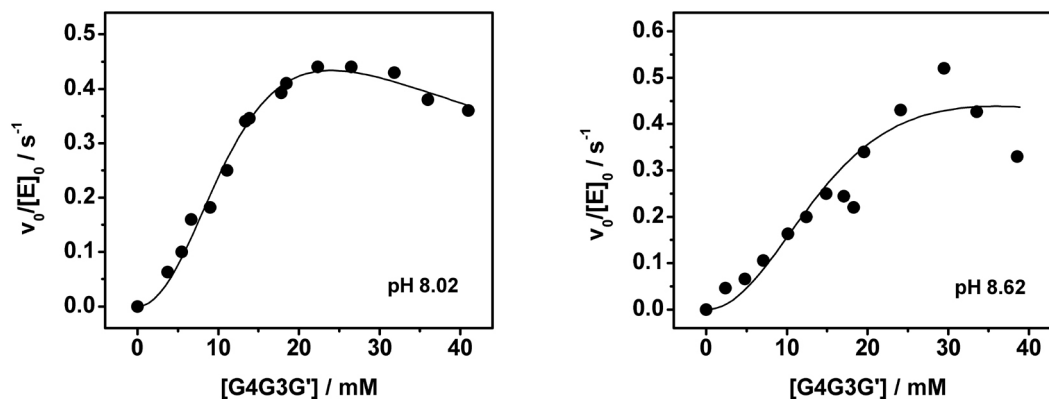


Figura 3.13. Cinètiques d'hydratació del glical G4G3G' amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. A les gràfiques es representa la $v_0/[E]_0$ enfront de la concentració de glical. Condicions de reacció: tampó 5.5 mM fosfat, 5.5 mM citrat, 0.1 mM CaCl_2 , a 30 °C, $[wt] = 1.86 \mu\text{M}$ a pH 4.03 i pH 8.62, $[wt] = 0.69 \mu\text{M}$ a pH 5.51, pH 5.98, pH 7.50 i pH 8.02, $[wt] = 0.61 \mu\text{M}$ a pH 4.99, $[wt] = 0.35 \mu\text{M}$ a pH 6.98 i $[wt] = 0.16 \mu\text{M}$ a pH 6.50. En els gràfics es mostren els ajusts a les dades obtingudes del model de la figura 3.12.

Taula 3.3. Paràmetres cinètics obtinguts en l'ajust del model de la figura 3.12 a les reaccions d'hydratació del glical G4G3G' catalitzada per la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

pH	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	K / mM^2	K_1 / mM	$(k_{\text{cat}}/K) / \text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-2}$
4.03	0.445 ± 0.008	199 ± 11	-----	0.0022 ± 0.0002
4.49	0.53 ± 0.01	70 ± 6	-----	0.0076 ± 0.0008
4.99	0.9 ± 0.1	65 ± 14	1.2 ± 0.8	0.014 ± 0.004
5.51	1.5 ± 0.2	58 ± 13	0.4 ± 0.2	0.026 ± 0.009
5.98	1.2 ± 0.1	27 ± 6	1.4 ± 0.7	0.04 ± 0.01
6.50	1.1 ± 0.1	52 ± 13	0.9 ± 0.6	0.021 ± 0.007
6.98	0.76 ± 0.08	37 ± 8	2.2 ± 1.4	0.021 ± 0.007
7.50	0.67 ± 0.04	67 ± 9	1.3 ± 0.5	0.010 ± 0.002
8.02	1.4 ± 0.5	436 ± 178	0.03 ± 0.03	0.003 ± 0.002
8.63	0.9 ± 0.6	472 ± 397	0.1 ± 0.3	0.002 ± 0.003

Desglossant les diferents etapes del mecanisme de la figura 3.13 es comprova que per tal de determinar el canvi de $\text{p}K_a$ dels residus catalítics en unir el glical al centre actiu es fa necessari obtenir els $\text{p}K_a$ cinètics que fan referència al complex d'activació SE i al complex productiu SES (figura 3.14). Amb aquesta finalitat s'hauria de conèixer el valor de la constant K_2 als diferents pH, per tal de poder comparar els $\text{p}K_a$ obtinguts a partir de la dependència amb el pH dels paràmetres, k_{cat} d'una banda, i k_{cat}/K_2 de l'altra.

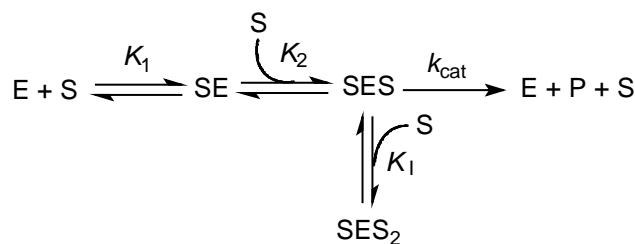


Figura 3.14. Mecanisme proposat per a les cinètiques d'hydratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Ara bé, amb els resultats obtinguts només es pot obtenir un bon ajust de la constant K , que és el producte de les dues constants de dissociació K_1 i K_2 . De manera que només en el cas que el valor de la constant d'activació (K_1) no varii amb el pH, el perfil de pH del paràmetre k_{cat}/K_2 podria assimilar-se al del paràmetre k_{cat}/K . De fet, en els gràfics de la figura 3.13 es comprova que a tots els pH el punt d'inflexió es dona a una concentració de substrat inferior a 5 mM força similar per a tots ells, per tant és possible que aquest sigui realment el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa.

A partir dels valors ajustats de k_{cat} i de k_{cat}/K , s'obtenen els perfils de pH que es mostren a la figura 3.15. S'observa que el perfil en k_{cat} no mostra la dependència en forma de corba gaussiana esperada, i que els valors de k_{cat} als dos pH més elevats, que són els que presenten un major error d'ajust, se situen molt per sobre del valor esperat. El perfil de pH de k_{cat}/K mostra una aparença més habitual, i tret del resultat a pH 6.5, la resta defineixen una corba gaussiana a partir de la qual s'obtenen uns pK_a cinètics de 5.6 ± 0.1 i de 6.7 ± 0.1 .

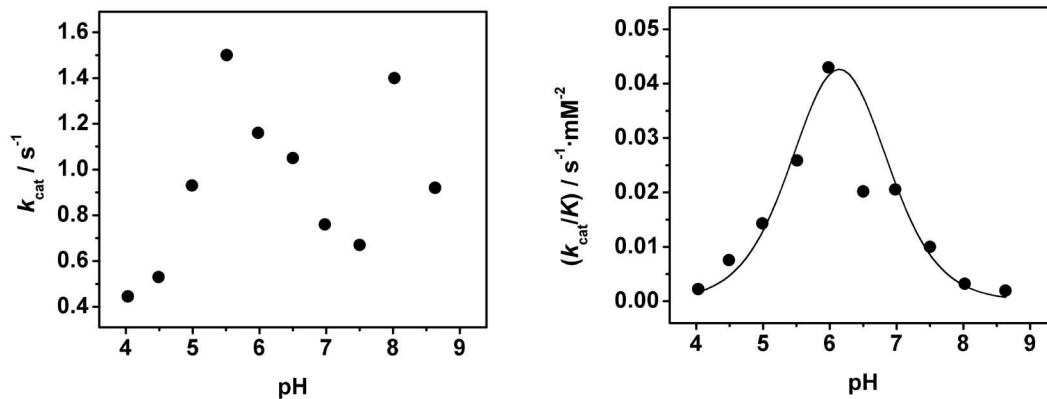


Figura 3.15. Perfils de pH en k_{cat} (corresponent al complex SES de la figura 3.14) i en k_{cat}/K per a la reacció d'hidratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Condicions de reacció: 5.5 mM fosfat, 5.5 mM citrat, 0.1 mM CaCl_2 , a 30 °C, [wt] = 1.86 μM a pH 4.03 i pH 8.62, [wt] = 0.69 μM a pH 5.51, pH 5.98, pH 7.50 i pH 8.02, [wt] = 0.61 μM a pH 4.99, [wt] = 0.35 μM a pH 6.98 i [wt] = 0.16 μM a pH 6.50.

Malgrat la dispersió dels resultats observada en el perfil de k_{cat} enfront del pH es pot ajustar una corba gaussiana als valors obtinguts fins a pH 7.5 (figura 3.16), obviant els dos darrers punts del perfil, que a més són els que presenten un major error d'ajust. Els pK_a cinètics obtinguts d'aquesta manera són de 4.5 ± 0.2 i de 7.3 ± 0.2 .

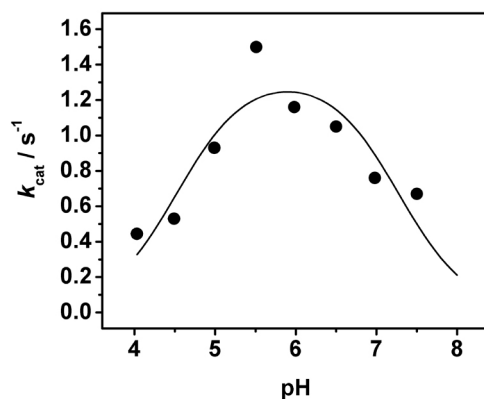


Figura 3.16. Ajust d'un sistema amb dos residus ionitzables al perfil de k_{cat} enfront del pH de la reacció d'hidratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Assumint que els pK_a cinètics poden atribuir-se als residus catalítics, la conclusió més important que es pot extreure del perfil de k_{cat} amb el pH és que a la primera etapa de reacció es valoren dos residus implicats directament en catàlisi. Aquest fet descarta l'opció que el glutamat 134 sigui el residu que actui alhora com a àcid general i com a nucleòfil, ja que de ser així, només s'hauria de valorar un únic residu catalític. Donat per tant, que la protonació del doble enllaç l'ha de realitzar un altre residu àcid, i que s'ha comprovat que el mutant D136A és altament inactiu, es pot proposar que sigui l'aspartat 136 el que realitzi la cessió de protó.

En el supòsit que la dependència amb el pH del paràmetre k_{cat}/K sigui un reflex del perfil de pH del paràmetre k_{cat}/K_2 , en comparar els pK_a cinètics obtinguts a partir dels dos perfils d'hidratació es comprova que, de forma similar al que succeeix en la reacció d'hidròlisi, el pK_a del nucleòfil disminueix en formar el complex productiu mentre que el pK_a del residu que actua com a àcid general augmenta (taula 3.4). La disminució del pK_a del nucleòfil és un altre argument en contra del seu paper com a cessor de protó. A la bibliografia sempre que es proposa que el residu que actua com a nucleòfil a la reacció d'hidròlisi actua també com a àcid general a la reacció d'hidratació de glicals, es justifica argumentant que es dona un augment del seu pK_a en la unió provocat per la proximitat del doble enllaç del glical. Ara bé, aquest canvi de pK_a no és més que un argument teòric, ja que no s'ha demostrat en cap cas. A la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, en el supòsit que la unió que dona lloc al complex SE sigui independent del pH, es comprova que en unir el glical G4G3G' al centre actiu el pK_a del nucleòfil no només no augmenta, sinó que disminueix, impedit d'aquesta manera que jugui el paper de cessor de protons. D'altra banda, l'augment de pK_a del residu que actua com a àcid general en unir el glical, segurament és degut a l'apantallament de la càrrega del nucleòfil sumat a una disminució de la hidrofília del seu microentorn.

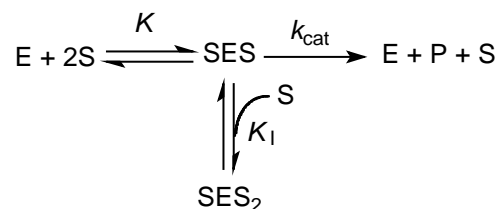
Taula 3.4. Comparació dels pK_a cinètics obtinguts en la reacció d'hidratació del glical G4G3G' i en la reacció d'hidròlisi del substrat G4G3G-MU a partir dels perfils de pH dels paràmetres k_{cat}/K (k_{cat}/K_M en la reacció d'hidròlisi) i k_{cat} .

	Perfil k_{cat}/K	Perfil k_{cat}
Hidratació G4G3G'		
pK_a 1	5.6 ± 0.1	4.5 ± 0.2
pK_a 2	6.7 ± 0.1	7.3 ± 0.2
Hidròlisi G4G3G-MU		
pK_a 1	5.2 ± 0.2	4.2 ± 0.2
pK_a 2	7.1 ± 0.2	7.5 ± 0.2

3.7. Conclusions

➤ La velocitat d'hidratació del glical G4G3G' per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa salvatge és del mateix ordre de magnitud que la velocitat d'hidròlisi de substrats trisacàridics com el G4G3G-MU. Aquest fet indica que la manca d'hidroxil a C2 en la unitat que ocupa el subseti -1 d'aquest pseudosubstrat no comporta majors problemes per a la seva transformació química.

➤ Les cinètiques d'hidratació del glical G4G3G' enfront de la concentració de substrat mostren un comportament més complex que el comportament michaelià, que inclou tant una etapa d'activació al·lostèrica com una etapa d'inhibició acompetitiva per substrat. Es proposa el següent mecanisme mínim per tal de descriure la reacció:



➤ La mutació a alanina dels tres carboxilats situats al voltant del subseti -1, el Glu138, el Glu134 i l'Asp136, comporta una pèrdua quasi total d'activitat respecte de l'enzim salvatge. En el millor dels casos es conserva un 0.3% d'activitat amb el mutant E138A. Aquest resultat implica un paper essencial per a l'aspartat 136 en la reacció d'hidratació de glicals.

➤ El perfil de k_{cat} enfront del pH (obviant els resultats als dos pH més bàsics) mostra un comportament en forma de corba gaussiana a partir de la qual s'obtenen uns pK_a cinètics de 4.5 ± 0.2 i de 7.3 ± 0.2 . El pK_a de 4.5 correspon al glutamat 134 i el de 7.3 s'assigna a l'aspartat 136, que es proposa que sigui el residu que actua com a àcid general.

➤ En el supòsit que la unió de substrat per tal de formar el complex d'activació SE sigui independent del pH, el perfil de k_{cat}/K_2 enfront del pH mostra un comportament en forma de corba gaussiana a partir de la qual s'obtenen uns $\text{p}K_a$ cinètics de 5.6 ± 0.1 i de 6.7 ± 0.1 , que s'assignen als $\text{p}K_a$ del glutamat 134 i de l'aspartat 136 respectivament, en el complex d'activació. En aquest cas és important remarcar la disminució del $\text{p}K_a$ que s'assigna al glutamat 134 en unir el glical, que corrobora la proposta que aquest residu no pot fer alhora el paper de nucleòfil i de cessor de protons en la primera etapa catalítica.