

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

6.1. Relacions lineals d'energia lliure. Equació de Hammett i equació de Brønsted

Una de les eines emprades per a l'estudi del mecanisme d'una reacció es basa en l'aplicació de relacions lineals d'energia lliure (LFER) a les cinètiques de reacció. Hi ha dos tipus de LFER principals: aquelles en què es va variant l'estructura electrònica d'un dels reactius i s'obté una relació lineal d'energia lliure entre el logaritme de la constant de velocitat i un paràmetre estructural quantitatiu del reactiu, per exemple, les anàlisis de Hammett; i aquelles en què es varia sistemàticament el catalitzador de la reacció i s'estableix la dependència del logaritme de la constant de velocitat amb l'estructura electrònica del catalitzador, per exemple, les anàlisis de Brønsted.

Al comportament observat pot ajustar-se una equació, que en el cas de l'anàlisi de Hammett pren la forma:

$$\log k = \sigma \cdot \rho + \text{constant} \quad \text{Equació 6.1.}$$

on la σ , que és la constant de substituent, representa la mesura del canvi de distribució electrònica del reactiu, i es defineix com:

$$\sigma = \log K_X - \log K_H = pK_{a,H} - pK_{a,X} \quad \text{Equació 6.2.}$$

on el $pK_{a,H}$ i el $pK_{a,X}$ són els pK_a del reactiu base i el seu derivat substituït, respectivament. La k és la constant de velocitat de la reacció, i la ρ , o constant de reacció, és el valor obtingut en la correlació i dóna informació sobre el mecanisme de reacció. Els valors de la constant de reacció permeten descriure un mecanisme en base a dos criteris principals. D'una banda, el signe de la constant permet distingir entre una reacció nucleòfila o electròfila. Així, s'observen valors de ρ positius quan la reacció s'accelera en presència de grups acceptors de càrrega, indicatiu que es tracta d'una reacció nucleòfila; i valors de ρ negatius, es corresponen amb reaccions electròfiles. D'altra banda, el valor quantitatiu de la constant permet definir la susceptibilitat del centre de reacció als efectes dels substituents. Com més gran és el valor de la constant, més gran és el desenvolupament de càrrega en el centre de reacció a l'estat de transició, i més sensible és aquest als efectes dels substituents.

Les anàlisis de Brønsted s'apliquen al cas concret de les reaccions que impliquen transferència de protó amb catàlisi àcid/base general. L'equació deduïda en aquest cas, correlaciona el logaritme de la constant de velocitat de la reacció amb el pK_a del catalitzador:

$$\log k_{HA} = -\alpha \cdot \log K_a + \text{constant} = \alpha \cdot pK_a + \text{constant} \quad \text{Equació 6.3.}$$

El pendent d'aquesta equació se sol interpretar com el grau de transferència de protó o la quantitat de desenvolupament de càrrega en l'estat de transició.

En general, a la bibliografia s'anomenen anàlisis de Hammett a les correlacions que es realitzen amb la σ del substituent (de les quals n'hi ha moltes de tabulades), i anàlisis de Brønsted quan la correlació es fa amb el pK_a , encara que les modificacions s'introdueixin en els reactius o, en el cas dels enzims, en els substrats. En la present tesi s'estudia com afecta en les velocitats de reacció de primer i segon ordre l'estructura electrònica del substrat, i per tal de ser fidels al significat de les equacions, aquests estudis s'anomenen anàlisis de Hammett, tot i que la correlació es faci amb el pK_a del grup sortint. Cal tenir present que els valors de les σ del substituent i els valors de pK_a van en sentit contrari (la σ decreix a mesura que el pK_a augmenta), de manera que quan es representa una anàlisi de Hammett enfront del pK_a del reactiu, el sentit del pendent és l'invers a l'obtingut quan l'anàlisi es realitza enfront de la σ del substituent: pendents negatius indiquen reaccions nucleòfiles, i pendents positius indiquen reaccions electròfiles.

6.2. Aplicació de les relacions lineals d'energia lliure a la deducció del mecanisme enzimàtic

Com ja s'ha esmentat, una reacció enzimàtica consta com a mínim de dues etapes ben diferenciades. En una primera etapa reversible, es dona la unió del substrat al centre actiu de l'enzim, sense que això comporti cap formació ni ruptura d'enllaços covalents, i en una segona etapa, irreversible, té lloc la catàlisi de la reacció pròpiament dita, amb la conseqüent redistribució d'enllaços covalents.



Figura 6.1. Mecanisme mínim d'una reacció enzimàtica amb una primera etapa d'unió reversible i una segona etapa irreversible de catàlisi.

Aquest mecanisme en dues etapes fa que la interpretació d'una relació lineal d'energia lliure en el cas de les reaccions catalitzades per enzims pugui resultar més complexa que en el cas de les reaccions de química orgànica tradicional. D'una banda, el fet que els enzims catalitzin les reaccions al seu centre actiu fa que no només els efectes electrònics afectin les constants de velocitat observades, sinó que també entren en joc els efectes estèrics. D'altra banda, tant els uns com els altres poden afectar només l'etapa catalítica, o poden afectar tant la unió del substrat com la catàlisi. I en qualsevol dels dos casos, els diferents efectes provocats en qualsevol de les dues etapes no tenen per què anar en el mateix sentit, generant de vegades correlacions molt pobres. Per tal de minimitzar l'efecte sobre l'etapa d'unió, un requisit bàsic és que els diferents substrats s'uneixin a l'enzim al mateix lloc i amb la mateixa orientació respecte dels grups catalítics, de manera que les variacions estructurals del substrat afectin bàsicament l'etapa catalítica. Tot i així, l'elevada especificitat dels enzims pels seus substrats, generalment tan lloada i desitjada, pot interferir, i molt, en una anàlisi de Hammett, fins al punt que modificacions mínimes en l'estructura del substrat poden disminuir molt l'afinitat de l'enzim pel mateix, o inclús induir una unió no productiva que no es veuria amb altres substrats de la mateixa família. Per això, com menys discrimini l'enzim l'estructura del substrat, millor tendeix a ser la correlació de l'anàlisi de Hammett [451, 452].

En aquelles reaccions enzimàtiques en què hi ha més d'una etapa catalítica en un mecanisme lineal, l'anàlisi de Hammett permet discernir quina és l'etapa determinant de la velocitat de reacció. Aquesta característica es basa en el fet que, per a aquest tipus de mecanisme, la velocitat de reacció en estat estacionari reflecteix la velocitat de l'etapa més lenta. D'aquesta manera, en funció de la presència o manca de dependència de la velocitat de la reacció enfront a l'estructura electrònica del substrat es pot proposar quina és l'etapa determinant de la velocitat de reacció, tal i com succeeix en les anàlisis de Hammett que es realitzen amb glicosil hidrolases.

6.3. Anàlisi de Hammett aplicades a glicosil hidrolases. Interpretació dels resultats obtinguts en una anàlisi de Hammett

Les interpretacions de les anàlisis de Hammett es realitzen per comparació amb els resultats obtinguts en la hidròlisi no enzimàtica dels sucres en condicions àcides i alcalines. Per exemple, Nath va estudiar tant la hidròlisi alcalina com la catàlisi àcida específica de diferents aril α -D-glucopiranosids [453], mentre que Hall *et al.* van estudiar la dels aril β -D-glucopiranosids [454]. Aquests resultats permeten establir una relació entre el logaritme de la constant de velocitat d'hidròlisi espontània enfront del pK_a del grup sortint que defineix un pendent de -1 per a la hidròlisi alcalina de glucòsids mentre que la hidròlisi amb catàlisi àcida específica presenta un pendent petit i positiu, d'entre 0.02 i 0.2 [455]. El mateix s'ha realitzat amb alquil- [456] i aril β -D-galactopiranosids [457], aril β -D-N-acetilneuramínids [458], aril α -D-N-acetilneuramínids [459], ions N - β -D-galactosilpiridini [460] i amb ions N -(α -D-N-acetilneuraminil)piridini [461]. En altres casos els resultats s'han comparat amb la hidròlisi espontània d'aril acetals [462, 463], amb pendents, per a la relació del logaritme de la $k_{\text{espontània}}$ enfront del pK_a del grup sortint, menors o iguals a -1.2, i amb la hidròlisi amb catàlisi àcida específica d'alquil- [464] i aril acetals [465], amb pendents, per al logaritme de la velocitat d'hidròlisi enfront del pK_a del grup sortint, propers a zero.

Per tal de realitzar les anàlisis de Hammett, se solen fer servir famílies de glicòsids en què la part glicònica del substrat aconsegueix els requeriments estructurals mínims de l'enzim, i es va variant la part aglicònica dins d'una mateixa família de substituents, generalment ions piridini o fenols substituïts. Els diversos substrats que es fan servir per tal de realitzar l'anàlisi de Hammett poden diferir tant en la natura química del substituent de l'anell de piridina o fenòlic (grup R a la figura 6.2), com en la seva posició dins de l'anell o en el seu nombre, amb la finalitat de cobrir un marge de pK_a suficientment ampli per tal de poder realitzar la interpretació més general possible del mecanisme enzimàtic.

S'han estudiat nombrosos casos d'anàlisi de Hammett sobre glicosidases que actuen amb retenció de configuració. Com ja s'ha comentat, el mecanisme catalític bàsic d'aquests enzims consta de dues etapes (figura 6.2), la glicosidació, en què s'escindeix l'enllaç amb l'aglicona, i la desglicosidació, en què es dona la hidròlisi de l'intermedi covalent glicosil-enzim.

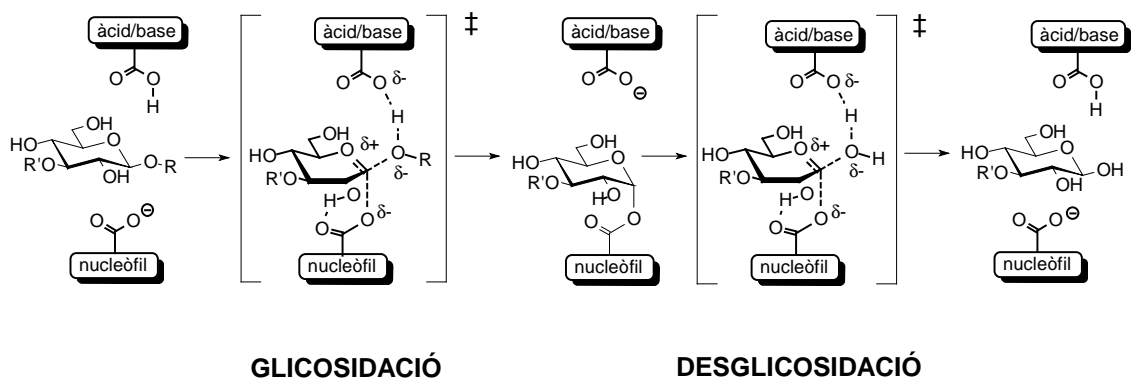


Figura 6.2. Mecanisme de reacció per a glicosidases que actuen amb retenció de configuració. A l'esquema es mostren les dues etapes catalítiques i l'estructura de l'estat de transició corresponent a cada etapa.

Com es pot veure a la figura 6.2, l'estat de transició corresponent a l'etapa de glicosidació mostra una estructura de caràcter oxocarbocatiònic en què l'enllaç amb l'aglicona encara no està del tot escindit. Això comporta que l'energia d'activació d'aquesta etapa depèn de la naturalesa química de l'aglicona. Un cop escindit aquest enllaç, l'intermedi covalent és comú per a tota la sèrie de substrats, de manera que l'estat de transició de l'etapa de desglicosidació té la mateixa energia d'activació per a tots els substrats. Com a resultat, si l'etapa determinant de la velocitat de reacció és l'etapa de desglicosidació, la velocitat de reacció resulta independent de la naturalesa de l'aglicona. Per contra, quan l'etapa determinant de la velocitat de reacció és la glicosidació el pendent del gràfic de Hammett és indicatiu del grau de desenvolupament de càrrega que es dona sobre l'oxigen fenòlic (o el nitrogen de l'ió *N*-glicosilpiridini). Com l'etapa de glicosidació es basa en un atac nucleofílic sobre el carboni anomèric, el pendent del gràfic de Hammett en una representació de $\log(k_{\text{cat}})$ o $\log(k_{\text{cat}}/K_M)$ enfront del $\text{p}K_a$ és negatiu. D'aquesta manera es comprova que com pitjor és l'habilitat de l'aglicona com a grup sortint (major $\text{p}K_a$), menor és la velocitat de l'etapa de glicosidació. A l'hora d'interpretar els resultats s'ha de tenir present l'estructura de l'estat de transició, ja que el grau de desenvolupament de càrrega a l'oxigen fenòlic no és directament indicatiu del grau d'escissió de l'enllaç. Per exemple, a l'estat de transició per a l'etapa de glicosidació (figura 6.3), s'estan produint tres fenòmens diferents: escissió d'enllaç C-O, cessió de protó a l'oxigen fenòlic per part de l'àcid general i atac del nucleòfil al carboni anomèric, i cadascun d'ells es desenvolupa en un grau diferent a les diferents glicosidases. Pel fet d'estar mesurant l'efecte sobre l'oxigen de l'enllaç a escindir, una anàlisi de Hammett no aporta cap tipus d'informació sobre la contribució per part del nucleòfil; per contra, aquest tipus d'estudi, i més en concret el pendent del gràfic de Hammett, dona una informació conjunta dels fenòmens de cessió de protó (o catàlisi àcida) i d'escissió d'enllaç.

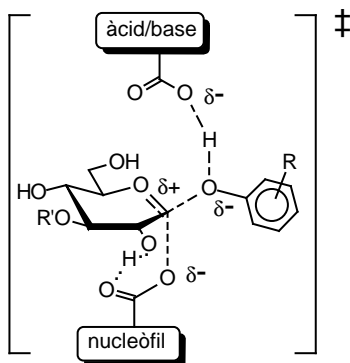


Figura 6.3. Estat de transició de l'etapa de glicosidació.

En el cas de les glicosidases que actuen amb inversió de configuració la interpretació de l'anàlisi de Hammett és més senzilla, ja que la catàlisi transcorre en una única etapa irreversible. En aquest cas, el pendent del gràfic de Hammett és directament proporcional al grau de desenvolupament de càrrega a l'oxigen fenòlic a l'estat de transició, que a l'igual que en el cas de les glicosidases que actuen amb retenció de configuració, és un compendi entre la transferència protònica i el grau d'escissió de l'enllaç glicosídic.

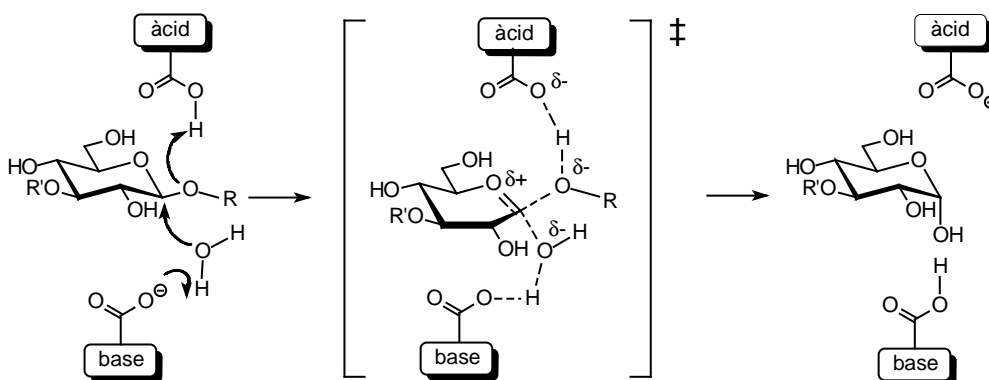


Figura 6.4. Mecanisme de reacció per a glicosidases que actuen amb inversió de configuració, en què s'inclou l'estructura de l'estat de transició.

Els dos objectius principals de l'anàlisi de Hammett són el de determinar l'etapa determinant de la velocitat de reacció, i el de determinar el grau d'escissió d'enllaç en l'estat de transició. Per tal d'aconseguir-ho a partir de les dades cinètiques es poden obtenir dues representacions de Hammett diferents que aporten resultats complementaris (figura 6.5). D'una banda la relació del $\log(k_{\text{cat}}/K_M)$ amb el $\text{p}K_a$ de l'aglicona (relació de Hammett en k_{cat}/K_M) dóna informació de la reacció fins després de la primera etapa irreversible. D'altra banda la relació del $\log(k_{\text{cat}})$ amb el $\text{p}K_a$ de l'aglicona (relació de Hammett en k_{cat}) dóna informació del mecanisme de reacció a partir de la primera etapa irreversible.

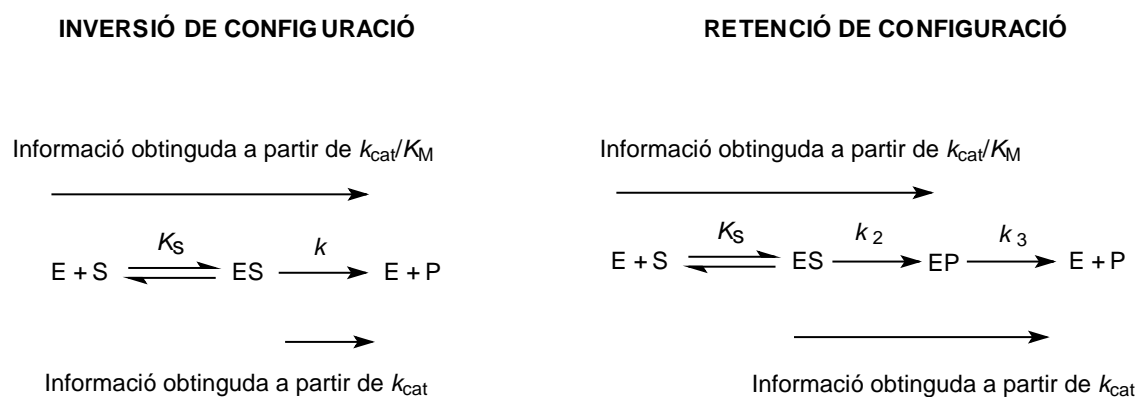


Figura 6.5. Informació que aporten les constants cinètiques de primer ordre (k_{cat}) i segon ordre (k_{cat}/K_M) en glicosidases que actuen amb inversió i amb retenció de configuració, respectivament.

En el cas de les glicosidases que actuen amb inversió de configuració si l'etapa d'unió no es veu afectada pel canvi d'aglicona i no resulta ser limitant de la velocitat de reacció en cap cas, les constants de velocitat de primer i segon ordre donen informació sobre la mateixa i única etapa catalítica, i per tant el gràfic de Hammett ha de ser idèntic en els dos casos (figura 6.6). Si el pendent dels dos gràfics és diferent i la correlació $\log(k_{cat})$ i $\log(k_{cat}/K_M)$ enfront del pK_a és bona, el resultat apunta que hi ha una etapa no química que és la determinant de la velocitat de reacció, ja sigui per una unió enzim-substrat lenta, possiblement a través de canvis conformacionals induïts per la unió del substrat (gràfics amb pendent ≈ 0 o bifàsics en k_{cat}/K_M), o per un alliberament lent del producte, amb implicació o no d'un canvi conformacional (gràfics amb pendent ≈ 0 o bifàsics en k_{cat}); si no és així els resultats apunten a un mecanisme enzimàtic més complex.

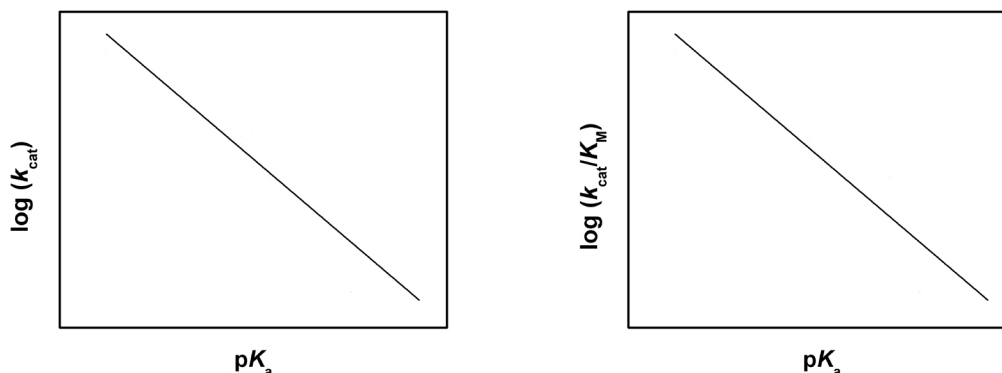


Figura 6.6. Gràfics de Hammett teòrics corresponents a una glicosidasa que actua amb un mecanisme bàsic d'inversió de configuració en dues etapes (unió i catàlisi). Els pendents en els dos gràfics han de ser iguals; qualsevol resultat diferent implica un mecanisme més complex.

Per a les glicosidases que actuen amb el mecanisme bàsic de retenció de configuració el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M dona informació de l'etapa d'unió i l'etapa de glicosidació, mentre que el gràfic en k_{cat} ho fa sobre l'etapa de glicosidació i la de desglicosidació (figura 6.7). En aquest cas, si la formació del complex de Michaelis és suficientment ràpida, els dos gràfics tenen el mateix pendent si la glicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció. Si, per contra, ho és total o parcialment la desglicosidació, el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M continua reflectint la glicosidació,

mentre que el gràfic en k_{cat} passa a tenir un pendent inferior per influència de l'etapa de desglicosidació (la velocitat de la qual és independent del $\text{p}K_{\text{a}}$ de l'aglicona). Pot donar-se el cas que, dins del grup de substrats estudiats, n'hi hagi alguns per als que la glicosidació sigui determinant de la velocitat de reacció i d'altres per als que ho sigui l'etapa de desglicosidació. En aquests casos, el gràfic en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ és un gràfic lineal, que reflecteix l'etapa de glicosidació, mentre que el gràfic en k_{cat} és un gràfic bifàsic amb dos pendents clarament diferenciats. A l'apèndix 3 es presenta un recull d'anàlisis de Hammett de diferents glicosidasas, que dóna idea de la diversitat de resultats i mecanismes descrits.

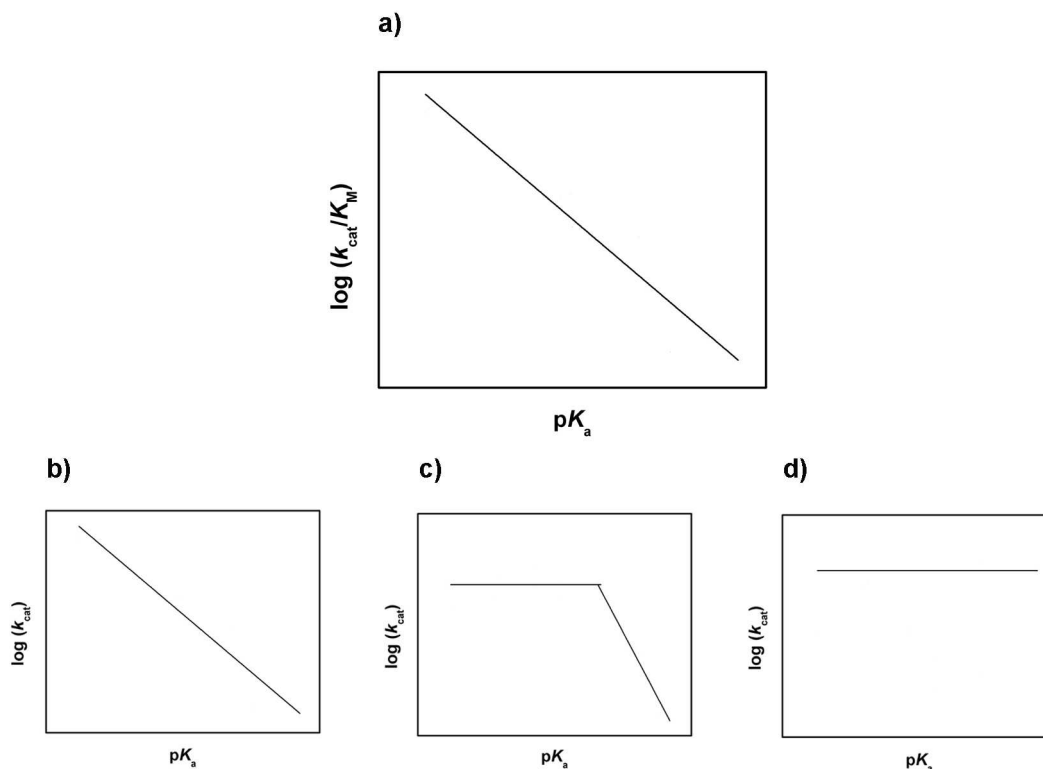


Figura 6.7. Gràfics de Hammett teòrics corresponents a una glicosidasa que actua amb un mecanisme bàsic de retenció de configuració en tres etapes (unió, glicosidació i desglicosidació). Mentre que el gràfic en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ és únic (a), hi ha tres possibles gràfics en k_{cat} en funció de les velocitats relatives de les dues etapes catalítiques: (b) glicosidació limitant per a tot el conjunt de substrats, (c) desglicosidació limitant per als substrats més reactius i glicosidació limitant per als menys reactius, i (d) desglicosidació limitant per a tot el conjunt de substrats.

A mode d'exemple es presenten les anàlisis de Hammett en k_{cat} i $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ de la β -glucosidasa de *Flavobacterium meningosepticum* [466] (figura 6.8). L'anàlisi de Hammett en k_{cat} indica que es tracta d'una glicosidasa que actua amb retenció de configuració per a la que l'etapa de glicosidació és la determinant de la velocitat de reacció per als substrats menys reactius ($\text{p}K_{\text{a}} > 7$), mentre que per als quatre substrats de menor $\text{p}K_{\text{a}}$ l'etapa de desglicosidació passa a prendre un paper predominant en el valor de la velocitat de reacció (equació 6.4; k_2 : velocitat de glicosidació i k_3 : velocitat de desglicosidació).

$$k_{cat} = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3} \quad \text{Equació 6.4.}$$

El pendent obtingut en aquesta anàlisi (-0.76) és similar a l'obtingut en l'anàlisi de Hammett en k_{cat}/K_M (-0.85) si s'ajusta una recta obviant els quatre substrats més reactius. Aquesta similitud confirma que queda reflectida la mateixa etapa catalítica (la glicosidació), i el seu valor correspon a un elevat grau de desenvolupament de càrrega sobre l'oxigen fenòlic, indicatiu d'una escissió d'enllaç avançada amb poca cessió protònica. La diferència entre els pendents dels dos gràfics de Hammett s'atribueix a la contribució de la velocitat de l'etapa de desglicosidació en el terme k_{cat} , (equació 6.4) que comporta una disminució del pendent d'aquesta anàlisi de Hammett. S'observa que el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M no és lineal per a tots els substrats, indicatiu que possiblement hi ha alguna etapa prèvia a la glicosidació que fa alentir la velocitat dels substrats més reactius, però en l'article en que es presenten aquests resultats no es comenta res al respecte.

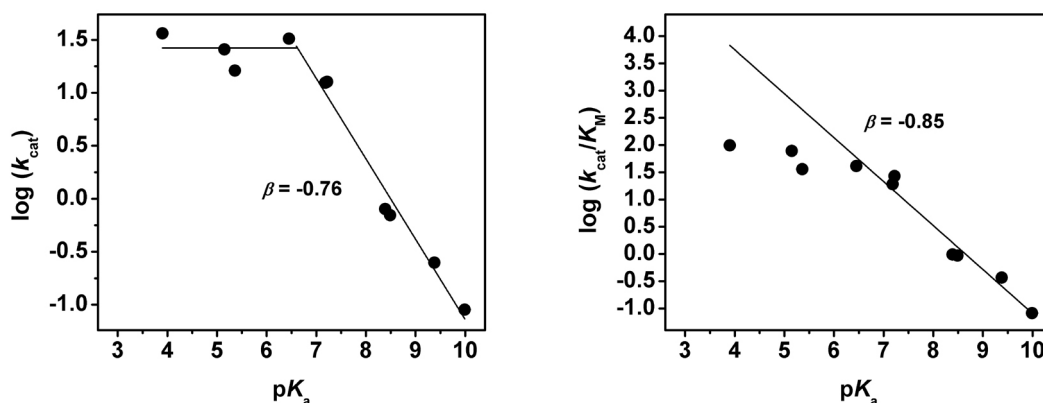


Figura 6.8. Anàlisi de Hammett en k_{cat} (esquerra) i en k_{cat}/K_M (dreta) per a la β -glucosidasa de *Flavobacterium meningosepticum* [466].

Les anàlisis de Hammett ja sigui en k_{cat}/K_M com en k_{cat} poden presentar correlacions no gaire bones amb el pK_a de l'aglicona. En les gràfiques en què es representa el logaritme de k_{cat}/K_M la dispersió es dona quan hi ha altres factors apart de l'electrònic que influeixen en aquest paràmetre. Aquests altres factors generalment són els efectes estèrics dels diferents substrats, que poden provocar diferències d'afinitat enzim-substrat significatives. En els casos d'algunes glicosidases s'ha comprovat que la introducció dels efectes estèrics en les correlacions de Hammett comporta una disminució important de la dispersió de resultats [467]. Pel que fa als efectes que causen una correlació pobre entre el logaritme de la k_{cat} i el pK_a de l'aglicona les causes són bàsicament tres, que es poden donar per si soles o combinades entre elles. Primerament, una determinació incorrecta del paràmetre k_{cat} com a conseqüència de valors elevats de K_M , que no permeten arribar a treballar amb concentracions de substrat suficientment elevades com per a determinar el paràmetre k_{cat} amb confiança. Segonament, la unió no productiva del substrat o producte de reacció en el centre actiu per a alguns dels substrats, donant lloc a una inhibició que pot emascarar els resultats. Finalment, que hi hagi una segona etapa parcialment determinant de la velocitat de reacció per a alguns dels substrats, que els aparti de la tendència lineal.

Apart dels resultats descrits, qualsevol altre resultat per a una anàlisi de Hammett que tingui una bona correlació entre els paràmetres estudiats és indicativa d'una etapa de

formació del complex de Michaelis o d'alliberament del producte de reacció lenta, o d'un mecanisme més complex.

6.4. Estudi del mecanisme enzimàtic de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Com a part de l'estudi mecanístic de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* s'ha realitzat una anàlisi de Hammett de l'enzim amb una família d'aril *O*- β -D-glicòsids amb l'estructura bàsica G4G3G-X, a 30 °C.

6.4.1. Antecedents

De cara a l'anàlisi de Hammett, és recomanable que l'enzim sigui prou específic per tal de poder utilitzar substrats que mantinguin un elevat grau d'afinitat, però alhora prou lax com perquè petites variacions en l'estructura del substrat no interfereixin significativament en la formació del complex de Michaelis. En el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* ja s'havia observat amb anterioritat que substrats amb la mateixa part glicònica (G4G3G) i aglicones tan diferents com una unitat sacarídica o una 4-metilumbel·liferona tenen constants de Michaelis similars tot i tenir velocitats d'hidròlisi molt diferents [223, 468] (figura 6.9). Aquests resultats fan pensar a priori que la 1,3-1,4- β -glucanasa és un bon candidat per tal d'efectuar una anàlisi de Hammett, i que petites variacions estructurals en la part aglicònica no repercutiran de manera significativa en la unió enzim-substrat. D'altra banda, per tal de realitzar l'anàlisi de Hammett es fan servir trisacàrids amb l'estructura bàsica G4G3G, que garanteixen una elevada afinitat enzim-substrat.

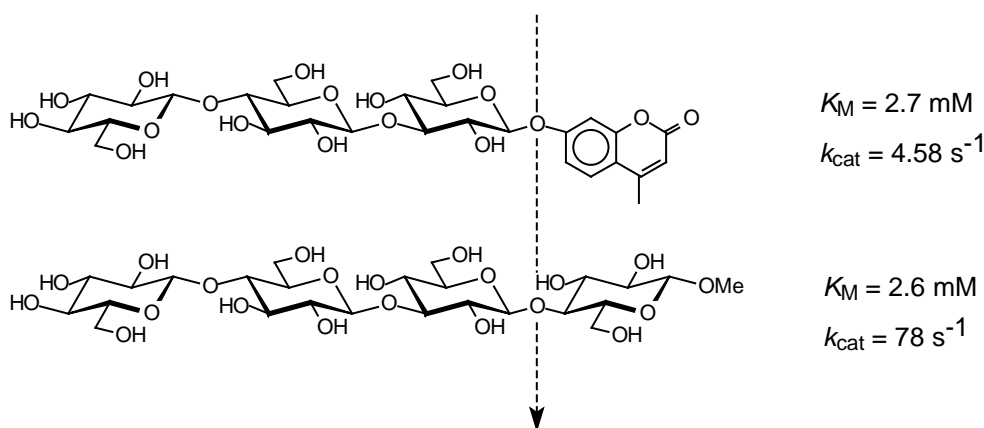


Figura 6.9. Estructura dels trisacàrids G4G3G-MU i G4G3G4GOMe, on s'indica l'enllaç que s'hidrolitza en la catàlisi enzimàtica per la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Al costat de cada substrat s'indica el valor dels paràmetres k_{cat} i K_M obtinguts en la seva hidròlisi enzimàtica per part de l'esmentat enzim en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, CaCl_2 0.1 mM, 55 °C [223].

Abans d'aquest treball ja s'havien realitzat unes anàlisis de Hammett de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa a 55 °C, que és la temperatura òptima de l'enzim per a la hidròlisi dels seus substrats naturals polimèrics [193]. Les cinètiques es van seguir per mesura de l'alliberament de l'aglicona cromofòrica per espectrofotometria d'UV-vis a la longitud d'ona corresponent en cada cas. El fet de treballar a temperatura elevada,

junt amb el fet que alguns dels substrats presentin molt bons grups sortints, va obligar a treballar amb concentracions d'enzim molt elevades per tal de poder obtenir velocitats d'hidròlisi enzimàtica com a mínim un ordre de magnitud superior a les velocitats d'hidròlisi espontània, posant en compromís la determinació de les velocitats inicials en la hidròlisi enzimàtica.

Els resultats obtinguts en aquestes anàlisis de Hammett es mostren a la figura 6.10, en què s'observa que tant el gràfic de Hammett en k_{cat} com en k_{cat}/K_M presenten una dependència bifàsica còncava cap amunt amb el $\text{p}K_a$ de l'aglicona. En aquesta figura s'ajusta una recta al gràfic de Hammett en k_{cat} per als dos valors de menor $\text{p}K_a$ només per tal de recalcar el canvi de pendent amb la resta de substrats, però no es pretén que aquest ajust reflecteixi la densitat de càrrega desenvolupada a l'estat de transició.

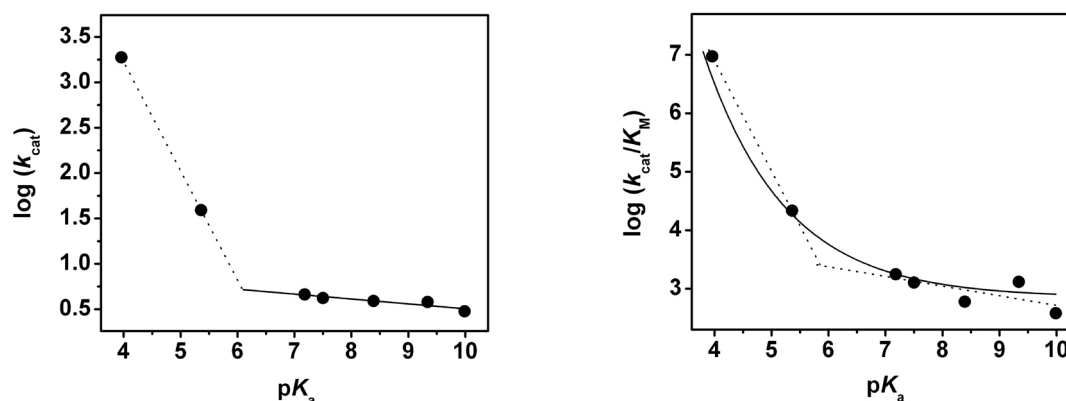


Figura 6.10. Anàlisi de Hammett en k_{cat} i k_{cat}/K_M de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb una família d'aril *O*- β -D-trisacàrids amb l'estructura bàsica G4G3G, a 55 °C i pH 7.2. En els gràfics es representa el logaritme del paràmetre k_{cat} enfront del $\text{p}K_a$ de l'aglicona (esquerra) i el logaritme del paràmetre k_{cat}/K_M enfront del $\text{p}K_a$ de l'aglicona (dreta).

En vista que els resultats no es poden interpretar fàcilment en el present treball es decideix realitzar una nova anàlisi de Hammett a 30 °C. A aquesta temperatura la hidròlisi espontània dels substrats es veu molt reduïda i permet treballar a una concentració d'enzim en què es pot determinar sense problemes la velocitat inicial d'hidròlisi enzimàtica. A més s'afegeixen dos substrats més amb aglicones de $\text{p}K_a$ inferior a 7, el G4G3G-2,3DNP (**22**) i el G4G3G-3,5DNP (**20**), per tal de poder definir amb més exactitud el grau de desenvolupament de càrrega que es dona a l'estat de transició.

6.4.2. Anàlisi de Hammett de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa a 30 °C

Per tal de realitzar aquesta segona anàlisi de Hammett es fa necessari obtenir enzim salvatge pur a nivell de mil·ligrams (veure capítol d'expressió i purificació enzimàtica), sintetitzar els diferents substrats emprats (veure capítol de síntesi) i caracteritzar-los espectroscòpicament, juntament amb les aglicones que alliberen en la seva hidròlisi (veure part experimental).

A les cinètiques enzimàtiques, un cop restat el valor de la hidròlisi espontània a cada concentració de substrat, s'han ajustat les equacions de Michaelis-Menten amb o sense

inhibició acompetitiva per substrat, fent servir en cada cas aquella que aporta un ajust millor. Els paràmetres obtinguts, junt amb el pK_a de l'aglicona alliberada en cada cas, es presenten a la taula 6.2.

Taula 6.2. Paràmetres cinètics de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* obtinguts en l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten, amb o sense inhibició acompetitiva per substrat, a les cinètiques realitzades amb una família d'aril β -D-trisacàrids. Les reaccions s'han dut a terme en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2 i a 30 °C.

Substrat	pK_a aglicona	k_{cat} / s^{-1}	K_M / mM	K_I / mM	$(k_{cat}/K_M) /$ $mM^{-1} \cdot s^{-1}$
G4G3G-P	9.99	0.49 ± 0.02	7.6 ± 0.4	55 ± 7	0.065 ± 0.005
G4G3G-P	9.99	0.43 ± 0.01	6.2 ± 0.3	---	0.069 ± 0.005
G4G3G-3NP	8.39	0.85 ± 0.01	1.28 ± 0.04	---	0.66 ± 0.03
G4G3G-MU	7.50	0.75 ± 0.02	0.93 ± 0.04	15 ± 1	0.80 ± 0.05
G4G3G-4NP	7.18	0.81 ± 0.02	0.73 ± 0.04	---	1.1 ± 0.1
G4G3G-3,5DNP	6.69	4.4 ± 0.2	0.46 ± 0.03	---	10 ± 1
G4G3G-3,5DNP	6.69	5.46 ± 0.04	0.57 ± 0.02	---	9.6 ± 0.4
G4G3G-3,4DNP	5.36	14.2 ± 0.2	0.44 ± 0.02	---	32 ± 2
G4G3G-3,4DNP	5.36	18.7 ± 0.2	0.37 ± 0.01	---	51 ± 2
G4G3G-2,3DNP	4.96	272 ± 6	1.28 ± 0.07	---	211 ± 15
G4G3G-2,4DNP	3.96	590 ± 14	0.18 ± 0.01	---	3340 ± 300

La representació gràfica del logaritme de la constant cinètica k_{cat} o k_{cat}/K_M enfront del pK_a de l'aglicona de cada substrat rendeix els corresponents gràfics de Hammett (figura 6.11).

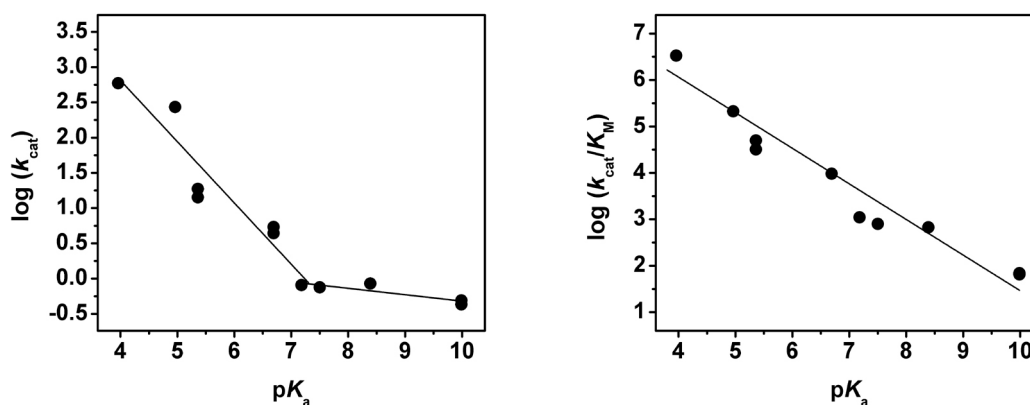


Figura 6.11. Anàlisi de Hammett en k_{cat} i k_{cat}/K_M de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb una família d'aril β -D-trisacàrids amb l'estructura bàsica G4G3G-X, en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2, a 30 °C. En els gràfics es representa el logaritme del paràmetre k_{cat} enfront del pK_a de l'aglicona (esquerra) i el logaritme del paràmetre k_{cat}/K_M enfront del pK_a de l'aglicona (dreta).

El gràfic de Hammett en k_{cat} mostra un comportament bifàsic, similar al que s'havia obtingut a 55 °C, en què els substrats que tenen aglicones amb pK_a inferiors a 7 defineixen una recta amb un pendent de -0.87 , i la resta de substrats descriuen una recta amb un pendent molt inferior, -0.09 . Per contra, el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M mostra una relació lineal entre el logaritme del paràmetre cinètic k_{cat}/K_M i el pK_a de les

aglicones amb un pendent de -0.77 , indicatiu d'un considerable grau de desenvolupament de càrrega en l'estat de transició de l'etapa de glicosidació. Aquest pendent és força similar al que s'ha obtingut per als substrats més activats en el gràfic de Hammett en k_{cat} , i donaria la idea que la glicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció per als substrats de $\text{p}K_{\text{a}}$ inferior a 7. Ara bé, és interessant plantejar-se què succeeix per als substrats en què el $\text{p}K_{\text{a}}$ de l'aglicona és superior a aquest $\text{p}K_{\text{a}}$.

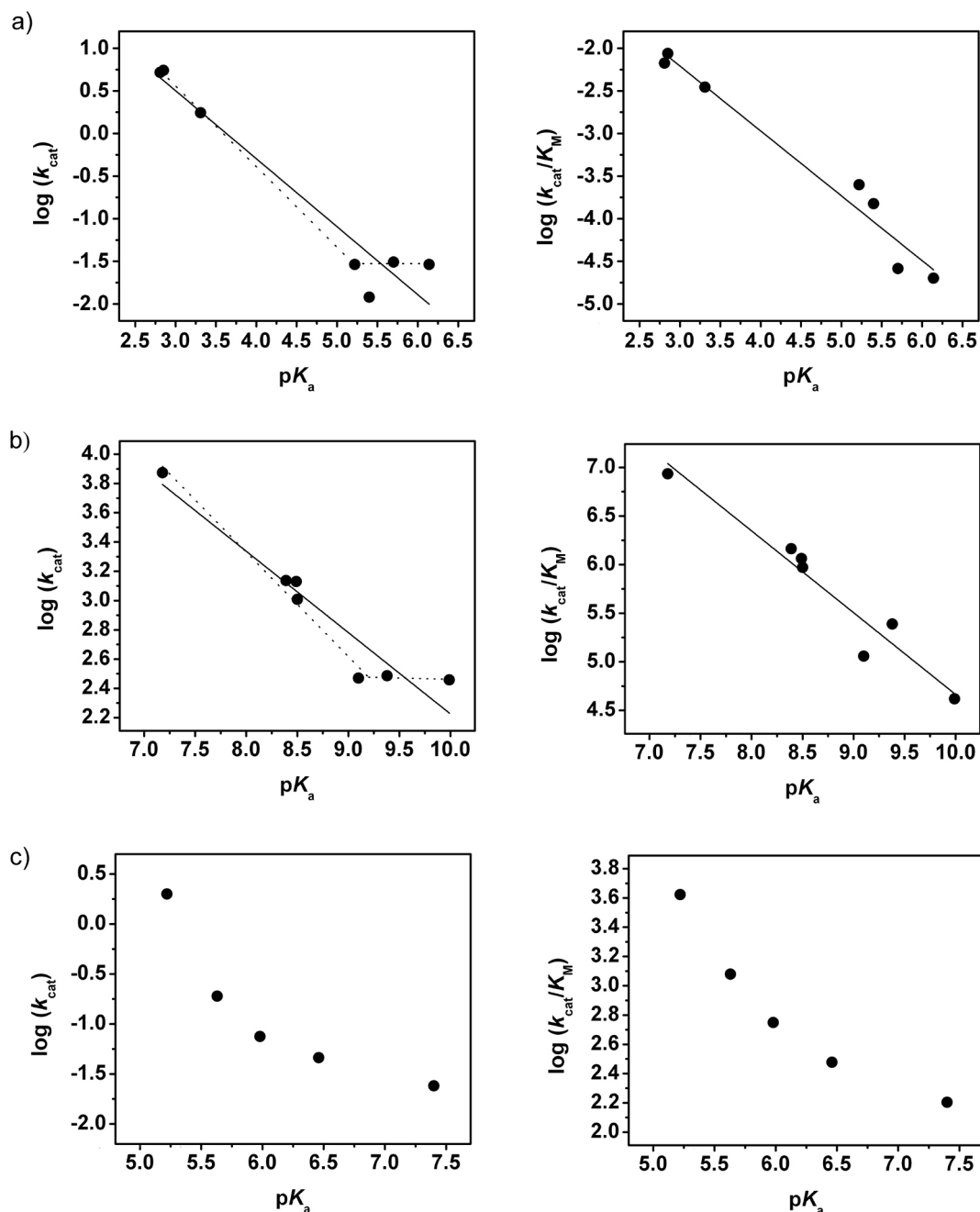


Figura 6.12. Anàlisi de Hammett en k_{cat} i en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ de: **a)** la β -galactosidasa *ebg*⁰ d'*Escherichia coli* amb una família d'ions *N*-(β -D-galactopiranosil)piridini, **b)** la neuraminidasa de *Salmonella typhimurium* amb una família d'aril *N*-acetil- α -D-neuramínids i **c)** sialidasa de *Vibrio cholerae* amb una família d'ions *N*-(α -D-*N*-acetilneuraminil)piridini. En els casos en què hi ha dos ajusts, l'ajust amb una línia contínua correspon a l'ajust efectuat pels autors, mentre

que l'ajust amb una línia puntejada mostra un possible comportament bifàsic similar a l'observat amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Tot i que de vegades no s'hagin presentat amb tanta claredat com l'anàlisi de Hammett de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* aquí descrita, a la bibliografia es poden trobar anàlisis de Hammett de glicosidases amb gràfics en k_{cat} similars als de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Alguns d'ells es mostren a la figura 6.12. Els casos **a** i **b**, corresponen a les anàlisis de Hammett de la β -galactosidasa ebg^0 d'*Escherichia coli* [469] i a la neuraminidasa de *Salmonella typhimurium* [470], respectivament. En cap dels dos casos els autors de l'article esmenten el comportament bifàsic i senzillament ajusten un comportament lineal tant al gràfic de Hammett en k_{cat} com en k_{cat}/K_M . Per a la neuraminidasa arriben a la conclusió que hi ha una etapa posterior a la catàlisi, possiblement una etapa d'alliberament d'aglicona, que influeix parcialment en la velocitat de reacció ja que el pendent dels gràfics de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M és diferent. Per a la sialidasa de *Vibrio cholerae* [471], cas **c** de la figura 6.12, els autors presenten amb claredat el comportament bifàsic de les anàlisis de Hammett i primerament plantegen l'opció més evident, que implica un canvi de mecanisme de S_N1 a S_N2 , però posteriorment la descarten com a conseqüència de la manca de correlació entre aquest canvi de mecanisme i la variació relativa de les velocitats de reacció entre els diferents substrats. Els autors realitzen l'estudi d'aquest enzim sota el prisma que tingui el mateix mecanisme enzimàtic que la sialidasa del virus de la grip A, per a la que es proposa que en el mecanisme de reacció hi ha dos canvis conformacionals cinèticament significatius, un que acompanya la formació del complex de Michaelis i l'altre concomitant amb el posterior alliberament del producte de reacció. Diuen que probablement la curvatura té a veure amb problemes estèrics al centre actiu, de forma que per als substrats més inactius deu donar-se un alentiment del canvi conformacional que està concertat amb la hidròlisi i passa a ser significatiu a nivell cinètic provocant la curvatura observada en els gràfics de Hammett. El mecanisme proposat suposa un canvi en la velocitat del canvi conformacional en funció de la naturalesa electrònica del substrat que, encara que els autors no ho esmenten, s'hauria de donar tant en el canvi conformacional previ a les etapes catalítiques, com al canvi conformacional posterior a les mateixes. D'aquesta forma, els gràfics de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M sí estarien reflectint etapes del mecanisme similars. Tot i així, l'explicació continua sense ser encertada, ja que es parla d'un alentiment de la velocitat de reacció per als substrats menys reactius, i el que s'observa és que per a aquests substrats la velocitat resulta ser superior al que seria d'esperar seguint la tendència marcada pels substrats més reactius.

6.4.2.1. Anàlisi dels gràfics de Hammett de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en base a un mecanisme de retenció de configuració en dues etapes



Figura 6.13. Mecanisme bàsic de retenció de configuració en dues etapes.

Per similitud amb els casos que s'observen descrits en la bibliografia (veure apèndix 3 apartat A3.4.3) el canvi de pendent observat en l'anàlisi de Hammett en k_{cat} de la 1,3-

1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* hauria d'atribuir-se a un canvi de mecanisme d'un grup de substrats respecte de l'anterior. Segons el mecanisme bàsic de retenció de configuració (figura 6.13) i tal i com s'ha descrit per al lisozim de clara d'ou [472, 473] i la β -glucuronidasa lisosomal del fetge de rata [474], a l'etapa de glicosidació es podria produir una competència entre l'atac del nucleòfil al centre anomèric i la catàlisi àcida per part del residu que actua com a àcid/base general. Així s'explicaria que per als substrats menys activats (pK_a aglicona > 7) guanyés pes la catàlisi àcida necessària per a l'alliberament de l'aglicona, rendint un estat de transició amb molt poc desenvolupament de càrrega, per estar protonat l'oxigen glicosídic de l'enllaç a escindir; mentre que per als més activats (pK_a aglicona < 7) la protonació no fos tan necessària i la glicosidació es regís bàsicament per l'atac nucleofílic, amb gran desenvolupament de càrrega a l'estat de transició, per manca de protonació.

Hi ha una altra opció que també podria considerar-se per a l'explicació del gràfic de Hammett en k_{cat} sense renunciar al mecanisme bàsic de retenció de configuració. En aquest plantejament el canvi de pendent observat podria ser degut a un canvi de posicionament de l'aglicona en el subseti +1. Curiosament, les aglicones amb pK_a inferior a 7 corresponen als fenols disubstituïts (2,4-, 2,3-, 3,4- i 3,5-dinitrofenol), mentre que les aglicones amb pK_a superior a 7 són monosubstituïdes a excepció de la 4-metilumbel·liferona, que té un anell disubstituït formant part d'un sistema bicíclic. És possible que per factors estèrics aquests dos grups de substrats posicionessin l'aglicona de forma diferent al centre actiu de manera que les interaccions que s'estableixen entre el substrat i els residus catalítics siguin diferents. No estariem parlant d'un canvi de posicionament que afectés significativament la constant d'afinitat, sinó d'un canvi més fi que es posaria de relleu a l'estat de transició. Aquest canvi de posicionament podria anar lligat a un canvi de mecanisme, per major proximitat a un o altre residu catalític, a l'igual que es proposa per al lisozim de clara d'ou [48]. A més, podria donar-se el cas que el canvi de posicionament es traduís en una pèrdua de conjugació de l'oxigen glicosídic amb l'anell aromàtic per als substrats menys reactius, de manera que no es poguessin transmetre els efectes electrònics dels substituents.

Aquestes dues interpretacions del gràfic de Hammett en k_{cat} per elles mateixes, serien possibles, però la comparació dels gràfics de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M deixa clar que la causa del canvi de pendent del gràfic en k_{cat} és posterior a l'etapa de glicosidació, ja que si no, el gràfic en k_{cat}/K_M hauria de reflectir el mateix comportament bifàsic. Certament també es podria ajustar un comportament bifàsic en el gràfic de k_{cat}/K_M , amb pendents de -1 per als substrats més activats i de -0.44 per a la resta (figura 6.14), però d'una banda, sembla una mesura que no és necessària ja que els resultats s'ajusten al comportament lineal d'una manera prou correcta, i de l'altra, perquè aquest ajust tampoc resol res a nivell mecanístic, ja que el pendent que s'obté per als substrats menys activats està molt per sobre del que s'observa en el gràfic de Hammett en k_{cat} . És a dir, que tot i ajustant dues rectes en el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M , la conclusió a la que s'arriba comparant els gràfics en k_{cat} i en k_{cat}/K_M és que per als substrats menys activats el gràfic en k_{cat} reflecteix quelcom més que no es fa palès en el gràfic en k_{cat}/K_M . De manera que aquests resultats, en concordança amb els resultats obtinguts en les cinètiques en estat preestacionari, fan pensar en un mecanisme més complex que el mecanisme senzill de retenció de configuració en dues etapes.

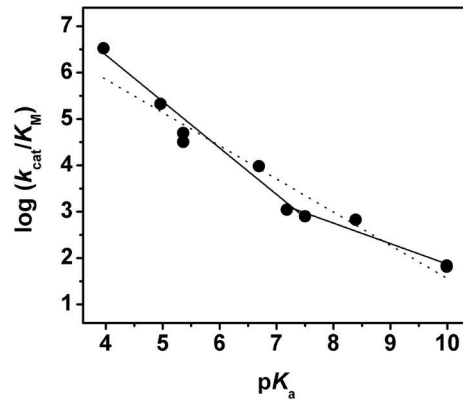


Figura 6.14. Comparació de l'ajust monofàsic i bifàsic per al gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. En el gràfic es representa el logaritme de la constant k_{cat}/K_M enfront del pK_a de l'aglicona del substrat. Les cinètiques es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2 i a 30 °C.

6.4.2.2. Possibles interpretacions de les anàlisis de Hammett de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Veient la limitació del mecanisme bàsic d'hidròlisi amb retenció de configuració s'ha de trobar un altre possible mecanisme que expliqui els resultats observats prenent com a referència les dues conclusions que semblen evidents a partir dels gràfics de Hammett obtinguts a 30 °C. La primera és que per als substrats més activats tant el gràfic de Hammett en k_{cat} com en k_{cat}/K_M reflecteixen l'etapa de glicosidació. La segona és que per als substrats menys activats hi ha alguna etapa posterior a l'etapa de glicosidació que fa augmentar la seva velocitat de reacció respecte del valor que seria esperable (figura 6.15). Aquesta segona conclusió per ella mateixa ja descarta qualsevol possibilitat de mecanisme lineal, ja que l'etapa determinant de la velocitat de reacció en un mecanisme lineal és sempre l'etapa més lenta. Per tant, si després de l'etapa de glicosidació hi hagués una etapa ràpida, no quedaria reflectida ni en el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M , ni en el gràfic de Hammett en k_{cat} , perquè la glicosidació seguiria essent l'etapa determinant de la velocitat de reacció.

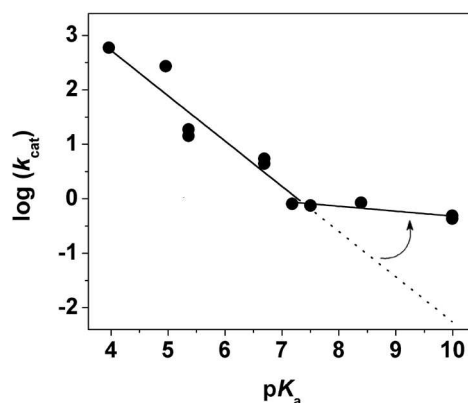


Figura 6.15. Anàlisi de Hammett de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en la que es mostra que el paràmetre k_{cat} per als substrats menys activats té un valor superior al que seria d'esperar si no hi hagués canvi de mecanisme.

Els resultats de les anàlisis de Hammett de la 1,3-1,4- β -glucanasa apunten doncs a un mecanisme enzimàtic ramificat, coincidint amb la conclusió a la que s'ha arribat a partir de les cinètiques en estat preestacionari. Només a partir dels resultats de l'anàlisi de Hammett no caldria recórrer a un mecanisme tan complex, tanmateix donat que els resultats en estat preestacionari han permès descartar un gran nombre de mecanismes ramificats, és lògic que l'estudi mecanístic de l'anàlisi de Hammett es realitzi sobre el model proposat a partir dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari. La figura 6.16 mostra aquest mecanisme deixant de banda les possibles etapes d'inhibició acompetitiva per substrat.

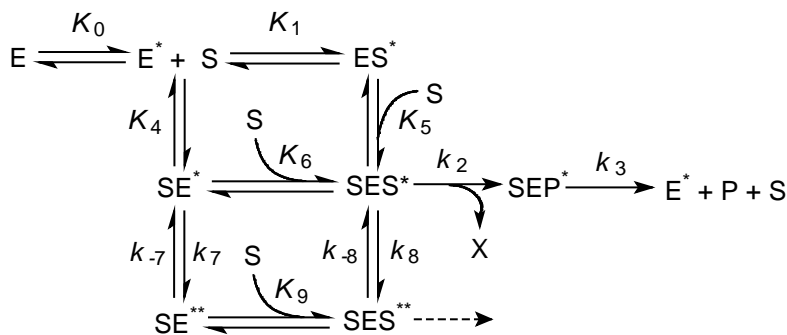


Figura 6.16. Mecanisme proposat per a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a partir dels resultats obtinguts en les cinètiques en estat preestacionari.

Si bé amb les dades obtingudes en estat preestacionari no es podia assegurar si l'espècie SES^{**} , resultant del canvi conformacional, presentava o no activitat enzimàtica, els resultats de les anàlisis de Hammett deixen clar que aquesta segona branca ha de ser també reactiva, donant lloc a l'augment de velocitat observat en el gràfic de Hammett en k_{cat} per als substrats menys reactius. Es proposa doncs, que el canvi conformacional implica un canvi d'entorn al centre actiu que va associat a una variació de l'activitat hidrolítica del complex SES^{**} respecte de la del complex SES^* . Aquesta possibilitat es recull en el mecanisme que es presenta a la figura 6.17, on l'activitat associada a SES^{**} ve descrita per les constants de velocitat k_{10} i k_{11} , corresponents a les etapes de glicosidació i desglicosidació de la segona branca, respectivament.

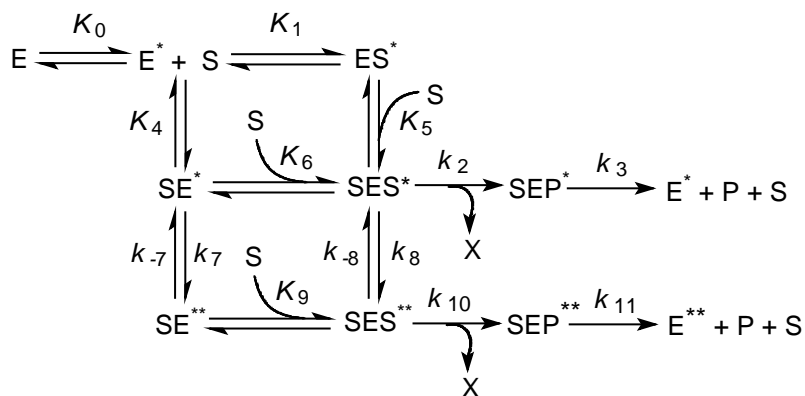


Figura 6.17. Mecanisme proposat per a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a partir dels resultats obtinguts en les cinètiques en estat preestacionari i les anàlisis de Hammett a 30 °C.

Les equacions 6.5 i 6.6 comporten l'expressió dels paràmetres cinètics k_{cat} i k_{cat}/K_M en funció de les diferents constants de velocitat per al mecanisme de la figura 6.17. Es comprova que mentre que k_{cat} és una combinació de les velocitats de les quatre etapes catalítiques, que inclou també la constant d'equilibri del canvi conformacional entre complexos ternaris (K_8), el terme k_{cat}/K_M representa una mitjana ponderada de les velocitats de les dues etapes de glicosidació.

$$k_{cat} = \frac{k_3 \cdot k_{11} \cdot (k_2 + K_8 \cdot k_{10})}{k_{11} \cdot (k_3 + k_2) + k_3 \cdot K_8 \cdot (k_{10} + k_{11})} \quad \text{Equació 6.5.}$$

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{K_4 \cdot (k_2 + K_8 \cdot k_{10})}{K_5 \cdot [K_4 + K_1 \cdot (1 + K_7)]} \quad \text{Equació 6.6.}$$

A partir dels resultats en estat preestacionari s'ha realitzat una aproximació de la magnitud de les constants de canvi conformacional K_7 i K_8 per a tres dels substrats amb què s'ha realitzat l'anàlisi de Hammett, el G4G3G-2,4DNP, el G4G3G-3,4DNP i el G4G3G-MU. S'ha arribat a la conclusió que el canvi conformacional és més pronunciat com menys reactiu és el substrat, de manera que, l'activitat de la segona branca pren més pes per als substrats menys activats. Així doncs, per als substrats més activats la velocitat observada correspondria majoritàriament a la velocitat de reacció a partir del complex ternari SES*, mentre que per als menys reactius, els gràfics de Hammett reflectirien bàsicament la velocitat de reacció a partir del complex SES**.

Tornant a avaluar el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M , és possible que l'ajust bifàsic realitzat, tot i que innecessari, aporti pistes sobre el desenvolupament de càrrega a les dues etapes de glicosidació. L'ajust rendeix un pendent de -1 per als substrats amb aglicones de pK_a inferior a 7 i un pendent de -0.44 per als substrats amb aglicones de pK_a superior a 7, que indicaria que l'estat de transició de l'etapa de glicosidació de la primera branca de reacció presenta un elevat grau de desenvolupament de càrrega amb una protonació bàsicament nul·la, mentre que l'estat de transició corresponent a l'etapa de glicosidació de la segona branca comporta un desenvolupament de càrrega força discret, ja sigui degut a una protonació molt més important, o a una menor escissió d'enllaç. En el cas d'ajustar una única línia recta, el pendent de -0.77 , representa una mitjana ponderada de les dues etapes de glicosidació.

Acceptant que el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M pugui reflectir les dues etapes de glicosidació, el fet que els pendents del gràfic de Hammett en k_{cat} siguin diferents als obtinguts per a les corresponents glicosidacions, indicaria un paper diferent per a les dues etapes de desglicosidació. Per als substrats amb aglicones de pK_a inferior a 7 és possible que s'arribin a assolir velocitats de glicosidació per als substrats més activats que siguin properes a la velocitat de desglicosidació, provocant d'aquesta manera la petita disminució de pendent observada respecte del pendent del gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M (pendent de -0.87 en el gràfic de Hammett en k_{cat} respecte al pendent de -1 en el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M). Per als substrats amb aglicones de pK_a superior a 7 el fet que el pendent del gràfic de Hammett sigui pràcticament nul, i que s'hagi comprovat que a l'etapa de glicosidació la protonació no és total (a partir del gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M , amb un pendent de -0.44), només deixa l'opció que per a la segona branca la desglicosidació sigui l'etapa determinant de la velocitat de reacció per a tots els

substrats. Hi ha una altra prova experimental que porta a pensar en una acumulació d'algun intermedi de reacció, que és la tendència que mostra la K_M a disminuir com més reactiu és el substrat. Aquest fet reforça la hipòtesi d'una etapa de desglicosidació limitant de la velocitat de reacció. L'equació 6.7 reflecteix la definició de la K_M per al mecanisme de la figura 6.17:

$$K_M = \frac{K_5 \cdot k_3 \cdot k_{11} \cdot [K_4 + K_1 \cdot (1 + K_7)]}{K_4 \cdot [k_{11} \cdot (k_2 + k_3) + K_8 \cdot k_3 \cdot (k_{10} + k_{11})]} \quad \text{Equació 6.7.}$$

Acceptant que l'etapa de desglicosidació de la primera branca és més ràpida que l'etapa de glicosidació de la mateixa branca ($k_3 \gg k_2$), aquesta expressió pot simplificar-se en l'equació 6.8:

$$K_M = \frac{K_5 \cdot [K_4 + K_1 \cdot (1 + K_7)]}{K_4 \cdot \left[1 + K_8 \cdot \frac{(k_{10} + k_{11})}{k_{11}} \right]} \quad \text{Equació 6.8.}$$

En aquesta equació es comprova que com més gran sigui la constant de velocitat k_{10} (constant de velocitat de l'etapa de glicosidació de la segona branca) sobre la constant de velocitat k_{11} (constant de velocitat de l'etapa de desglicosidació de la segona branca), inferior tendeix a ser el valor de la K_M .

Finalment s'ha de considerar el fet que, segons els gràfic de Hammett en k_{cat} , l'activitat de la segona branca passi a ser més ràpida que no pas la de la primera per als substrats menys reactius. De fet, el mecanisme ramificat amb una desglicosidació determinant de la velocitat de reacció per a la segona branca no exclou en absolut aquesta possibilitat. L'únic que s'ha d'acomplir és que la constant de velocitat per a l'etapa de desglicosidació de la segona branca sigui superior a la constant de velocitat per a l'etapa de glicosidació de la primera branca ($k_{11} > k_2$) per als substrats menys reactius.

Fent servir el mecanisme amb dues branques actives es pot explicar tant la diferència entre els gràfics de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M , com el canvi de mecanisme observat en el gràfic de Hammett en k_{cat} .

6.4.3. Anàlisi de Hammett a diferents pH

Una altra curiositat de l'anàlisi de Hammett en k_{cat} de la 1,3-1,4- β -glucanasa és el fet que el canvi de pendent es doni a un pK_a proper al pK_a del residu que fa el paper d'àcid/base general (pK_a 7.3). Per tal d'explorar una mica aquesta característica es trien quatre dels substrats amb els que s'han realitzat les anàlisis de Hammett i es realitzen cinètiques a quatre pH diferents, dos pH més àcids, 5.0 i 5.5, el mateix pH al que s'ha realitzat l'anàlisi de Hammett anterior, 7.2 (per tal de garantir la reproductibilitat de les dades), i un pH més bàsic, 8.0. Als dos primers pH s'espera que el residu que actua com a àcid general es trobi majoritàriament en la seva forma no ionitzada, a pH 7.2 estarà ionitzat aproximadament en un 50% i a pH 8.0 es trobarà bàsicament ionitzat en la seva totalitat.

A la taula 6.3 s'han recollit els resultats de les cinètiques amb els diferents aril β -D-trisacàrids als diferents pH. Algunes de les cinètiques s'han realitzat per duplicat per tal d'assegurar-ne els resultats, i a la taula es recullen les mitjanes dels resultats de les cinètiques duplicades, que són les que, per claredat, s'han representat en els gràfics de Hammett.

Taula 6.3. Paràmetres cinètics de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* obtinguts en l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten amb o sense inhibició acompetitiva per substrat a les cinètiques realitzades amb una sèrie d'aril *O*- β -D-trisacàrids, amb estructura bàsica G4G3G-X, a diferents pH. Les reaccions s'han dut a terme en tampó 11 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, I = 0.05 M, a 30 °C i pH 5.0, 5.5, 7.2 i 8.0.

pH	Substrat	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	K_{M} / mM	$(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}) / \text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
5.0	G4G3G-3,4DNP	15.6 ± 0.3	0.32 ± 0.02	49 ± 4
	G4G3G-3,5DNP	3.3 ± 0.1	0.40 ± 0.03	8.2 ± 0.8
	G4G3G-MU	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.4
	G4G3G-3NP	0.98 ± 0.04	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1
5.5	G4G3G-3,4DNP	16.3 ± 0.2	0.212 ± 0.007	77 ± 4
	G4G3G-3,5DNP	3.27 ± 0.03	0.204 ± 0.008	16.0 ± 0.6
	G4G3G-MU	1.20 ± 0.07	0.95 ± 0.09	1.3 ± 0.2
	G4G3G-MU	1.03 ± 0.04	0.70 ± 0.05	1.5 ± 0.2
	G4G3G-MU _{mitjana}	1.11 ± 0.01	0.8 ± 0.1	1.4 ± 0.1
	G4G3G-3NP	0.85 ± 0.01	0.92 ± 0.04	0.92 ± 0.05
7.2	G4G3G-3,4DNP	22 ± 3	0.5 ± 0.1	44 ± 15
	G4G3G-3,5DNP	2.87 ± 0.04	0.45 ± 0.02	6.4 ± 0.4
	G4G3G-MU	0.59 ± 0.01	0.67 ± 0.03	0.88 ± 0.05
	G4G3G-3NP	0.63 ± 0.02	1.9 ± 0.1	0.33 ± 0.03
	G4G3G-3NP	0.57 ± 0.02	1.4 ± 0.1	0.41 ± 0.04
	G4G3G-3NP _{mitjana}	0.60 ± 0.03	1.65 ± 0.06	0.36 ± 0.09
8.0	G4G3G-3,4DNP	7.3 ± 0.2	0.72 ± 0.05	10 ± 1
	G4G3G-3,5DNP	1.0 ± 0.2	1.5 ± 0.5	0.7 ± 0.4
	G4G3G-MU	0.271 ± 0.003	0.79 ± 0.03	0.34 ± 0.02
	G4G3G-3NP	0.48 ± 0.02	3.5 ± 0.2	0.14 ± 0.01
	G4G3G-3NP	0.31 ± 0.01	1.7 ± 0.1	0.18 ± 0.02
	G4G3G-3NP _{mitjana}	0.39 ± 0.08	2.6 ± 0.9	0.16 ± 0.02

Els gràfics de Hammett obtinguts a partir d'aquests paràmetres cinètics es mostren a la figura 6.18. Si bé és agosarat ajustar dues rectes emprant només quatre punts, per tal de realitzar aquests ajusts s'han pres com a referència els gràfics de Hammett complets realitzats a pH 7.2 i 30 °C, de manera que en aquells casos que ha estat convenient s'han ajustat dues rectes en els gràfics de Hammett en k_{cat} amb el punt d'inflexió a $\text{p}K_{\text{a}}$ 7.5, mentre que als gràfics de Hammett en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$, en què s'observa força dispersió de resultats, s'ha ajustat una línia recta. Ja a primer cop d'ull es comprova que el pH afecta tant el pendent com el comportament de l'enzim enfront dels diferents substrats en el gràfic de Hammett en k_{cat} , mentre que en el gràfic de Hammett en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ la variació és mínima. Aquesta divergència torna a indicar que en els dos gràfics queden reflectides etapes de reacció diferents.

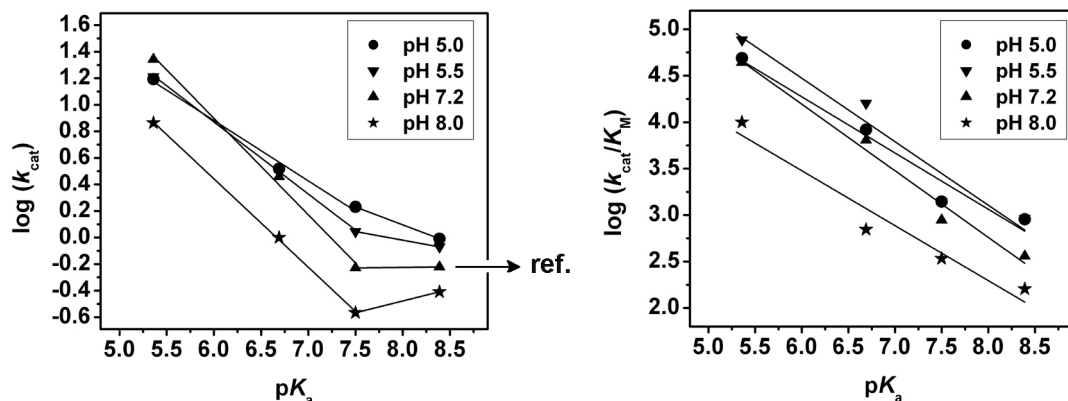


Figura 6.18. Anàlisi de Hammett en k_{cat} i k_{cat}/K_M de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb una sèrie d'aril *O*- β -D-trisacàrids, d'estructura bàsica G4G3G-X, en tampó 11 mM fosfat, 0.1 mM $CaCl_2$, a 30 °C i a 4 pH diferents, 5.0, 5.5, 7.2 i 8.0. En els gràfics es representa el logaritme del paràmetre k_{cat} enfront del pK_a de l'aglicona (esquerra) i el logaritme del paràmetre k_{cat}/K_M enfront del pK_a de l'aglicona (dreta). En el gràfic de Hammett en k_{cat} s'indica el pH que es pren com a referència per a la definició de les dues zones per analogia amb l'anàlisi de Hammett completa en k_{cat} realitzada amb vuit substrats.

Taula 6.4. Pendents ajustats als gràfics de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb 4 aril *O*- β -D-trisacàrids amb l'estructura bàsica G4G3G-X, a diferents pH. Les cinètiques s'han realitzat en tampó 11 mM fosfat, 0.1 mM $CaCl_2$, a 30 °C i a 4 pH diferents, 5.0, 5.5, 7.2 i 8.0.

pH	pendent Hammett en k_{cat}	pendent Hammett en k_{cat}/K_M
5.0	-0.40	-0.61
5.5	-0.54	-0.70
7.2	-0.73	-0.72
8.0	-0.67	-0.60

A la taula 6.4 es recullen els pendents que s'han ajustat als diferents gràfics de Hammett. A partir dels pendents obtinguts en el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M dona la sensació que el pH no afecta significativament les etapes de glicosidació ni el canvi conformacional entre els dos complexos ternaris enzim-substrat. Aquest darrer resultat coincidiria amb l'obtingut en les cinètiques en estat preestacionari, en què s'observa que la constant de canvi conformacional K_7 no varia significativament en el marge de pH entre 6.2 i 8.3. Tot i així, l'elevada dispersió dels resultats fa preferible no extreure'n gaires conclusions. Pel que fa referència als pendents obtinguts en el gràfic de Hammett en k_{cat} sembla que, en aquest cas, el pH sí que influeix en les etapes catalítiques, de manera que en acidular el pH del medi, per a la segona branca, la desglicosidació deixaria de ser, al menys totalment, determinant de la velocitat de reacció; i potser com a conseqüència, el pendent observat als dos pH més àcids seria una mitjana ponderada de les velocitats de glicosidació de les dues branques (amb major o menor influència de la velocitat de desglicosidació de la segona branca). Aquesta influència parcial de la velocitat de l'etapa de desglicosidació de la segona branca explicaria el fet que mentre que a pH 7.2 i 8.0 els pendents en el gràfic de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M siguin els mateixos, a pH 5.5 i 5.0 difereixin lleugerament. Hi hauria una altra possible explicació per als resultats observats en el gràfic de Hammett en k_{cat} , però llavors s'hauria d'acceptar que el canvi conformacional pugui dependre del pH, i que a les cinètiques

realitzades en estat preestacionari s'hagi treballat en un rang de pH fora d'aquell en el que s'observa la dependència. Així doncs, es podria pensar que a pH àcids ($\text{pH} < 6$) el canvi conformacional no és tan important, de manera que pren rellevància la primera branca de reacció per a tots els substrats, i conseqüentment deixa de quedar reflectida la segona branca en el gràfic de Hammett en k_{cat} . En aquest cas, la diferència de pendents observada entre els gràfics de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M estaria relacionada amb una desglicosidació (per a la primera branca) que es faria parcialment determinant de la velocitat de reacció a pH àcids.

Un altre resultat que apunta cap a un mecanisme complex amb dues activitats són els perfils de pH que s'intueixen amb els quatre substrats utilitzats per tal de realitzar aquest estudi de Hammett a diferents pH. Es considera que el perfil de pH en k_{cat}/K_M permet obtenir els $\text{p}K_a$ cinètics de l'enzim lliure, que generalment s'associen als $\text{p}K_a$ dels residus que actuen com a nucleòfil i com a àcid/base general. Aquests $\text{p}K_a$, propis de l'enzim, no tenen perquè variar en funció del substrat amb el que es realitza l'estudi de pH, és a dir, si estiguéssim davant d'un mecanisme lineal, els perfils de pH obtinguts amb els quatre substrats haurien de ser iguals.

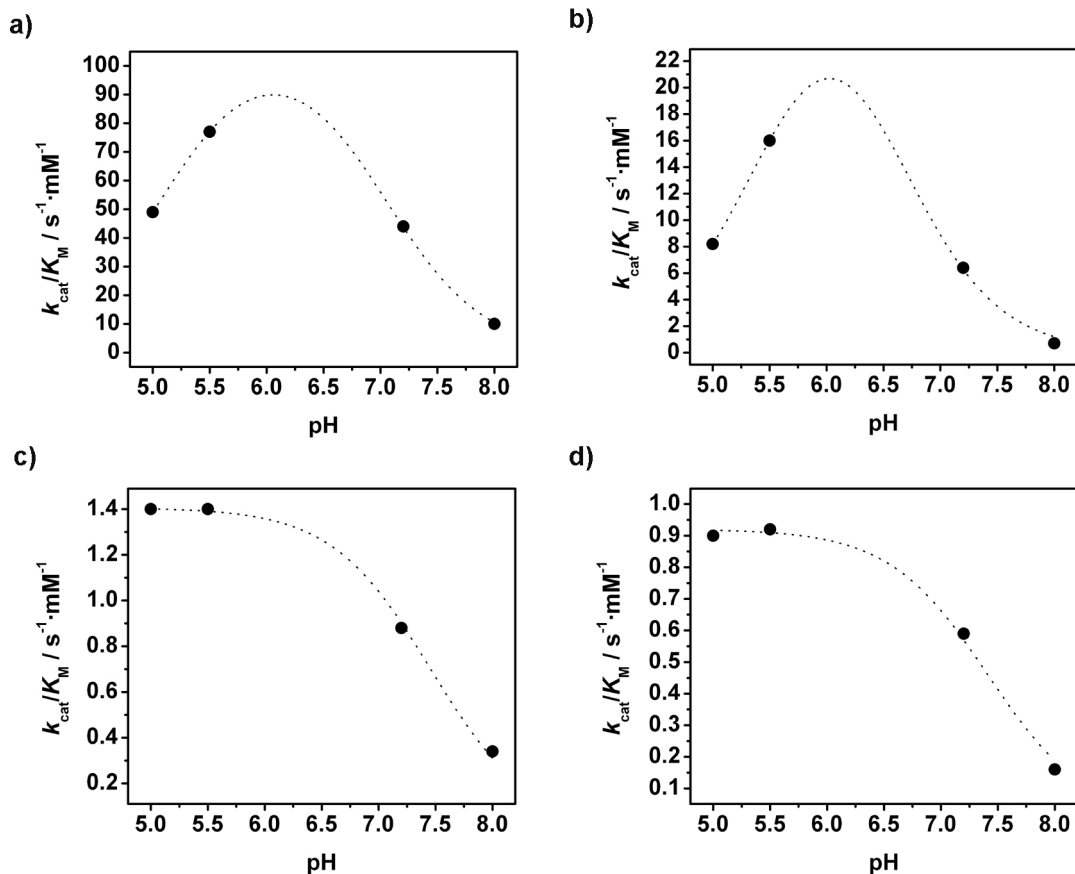


Figura 6.19. Perfils d'activitat enfront del pH de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb quatre substrats diferents: **a)** G4G3G-3,4DNP, **b)** G4G3G-3,5DNP, **c)** G4G3G-MU i **d)** G4G3G-3NP. En els gràfics es representa el paràmetre cinètic k_{cat}/K_M enfront del pH del medi. Les cinètiques s'han realitzat en tampó 11 mM fosfat, 0.1 mM CaCl_2 , a 30 °C i a 4 pH diferents, 5.0, 5.5, 7.2 i 8.0.

A la figura 6.19 es mostren els quatre perfils de pH que s'han ajustat amb els resultats obtinguts. Evidentment tan sols amb quatre punts no es pot realitzar un perfil d'activitat enfront del pH acceptable, però aquests perfils com a mínim permeten veure dos tipus diferents de comportament enfront del pH, que donen a entendre que s'estan valorant dues activitats enzimàtiques diferents.

S'ha de ser molt caut amb la interpretació dels resultats obtinguts de les anàlisis de Hammett a diferents pH, i de fet, seria convenient caracteritzar adequadament el comportament de l'enzim a través d'una sèrie d'anàlisis de Hammett complertes a un ventall de pH més ampli, abans d'extreure'n conclusions. Llavors també es disposaria de més dades que permetrien definir millor els perfils de pH i els pK_a cinètics obtinguts fent servir els diferents substrats, i valorar-ne les diferències. Amb això present, sembla que la similitud entre el pK_a cinètic assignat al residu que actua com a àcid/base general i el pK_a al què es dona el canvi de pendent, tret que havia motivat el present estudi, possiblement no és més que una mera casualitat. I a l'igual que s'ha observat en altres glicosidases en què s'ha realitzat un perfil de pH acompanyant les anàlisis de Hammett, el punt d'inflexió observat en els gràfics de Hammett no guarda relació amb els pK_a cinètics que s'atribueixen als residus catalítics [37, 374, 475].

6.4.4. Efectes de la mutació del residu W221 en l'entorn del residu àcid/base general: pK_a cinètics i anàlisi de Hammett

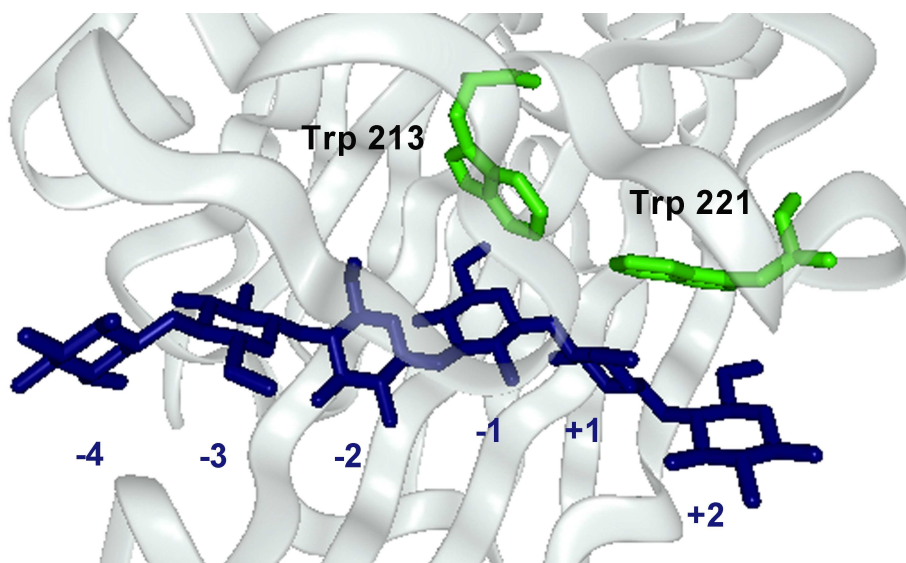


Figura 6.20. Estructura del centre actiu en el complex de la 1,3-1,4- β -glucanasa amb l'hexasacàrid G4G4G3G4G4G, en què es mostren dos dels triptòfans presents al centre actiu que obliguen al substrat a adoptar una conformació en forma de "V" al voltant dels residus catalítics.

Tot i la seva hidrofobicitat, s'ha observat amb freqüència la presència de residus de triptòfan al centre actiu de les proteïnes. Els triptòfans, apart d'aportar estabilitat tèrmica [476] i estabilitzar l'estructura quaternària de la proteïna [477, 478], en el cas de les glicosidases juguen també un paper important en la unió del substrat [17, 328]. A més, la presència d'un residu aromàtic al costat del residu que actua d'àcid general col·labora en el correcte posicionament d'aquest residu, i juga un paper clau en la definició del seu

pK_a , com s'ha observat en diverses glicosidases [320, 479, 480]. A l'estructura del modelatge de l'hexasacàrid G4G4G3G4G4G al centre actiu de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* es comprova que al centre actiu hi ha dos triptòfans situats a l'entorn del residu que actua com a àcid general i que pel seu posicionament a la proteïna obliguen a una torsió de la cadena polisacàridica en forma de "V" (figura 6.20), torsió que es dona precisament a l'enllaç glicosídic a escindir, i que s'ha descrit també en el complex de Michaelis en el cas d'altres glicosidases [49, 50, 69, 80, 81, 369, 481-485]. S'ha proposat que aquesta conformació tensionada al voltant de l'enllaç glicosídic a escindir, forçada per la proteïna, ajudi a adoptar la conformació distorsionada a l'anell de piranosa que ocupa el subseti -1, apropant-la a la de l'estat de transició i ajudant d'aquesta manera a reduir l'energia d'activació de la reacció.

En aquest sentit, i tal com ja s'ha comentat a la introducció, sembla que les interaccions que es donen en el subseti +1 són claus perquè es doni aquesta torsió de la cadena que va acompanyada de la distorsió de la piranosa que ocupa el subseti -1. A la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* el triptòfan 221 es troba formant part del subseti +1 molt proper al glutamat 138, i el present estudi vol avaluar la influència d'aquest residu en la definició del pK_a del residu que actua com a àcid/base general, i en el mecanisme enzimàtic. Amb aquest propòsit, s'han d'obtenir a nivell d'ADN els mutants W221F, en què el triptòfan se substitueix per una fenilalanina, disminuint el volum del residu aromàtic, i W221A, en què el triptòfan se substitueix per una alanina, eliminant totalment el residu aromàtic; i a continuació cal expressar i purificar els dos mutants a nivell de mil·ligram. Les etapes per a l'obtenció dels mutants a nivell d'ADN i la posterior obtenció dels mutants s'explica al capítol d'expressió i purificació enzimàtica.

6.4.4.1. Perfil d'activitat enfront del pH del mutant W221A

Per tal d'avaluar el paper del triptòfan 221 en la definició del pK_a del residu que actua com a àcid/base general es realitza un perfil de pH del mutant W221A. Ajustant una gaussiana als perfils dels paràmetres cinètics k_{cat} i k_{cat}/K_M enfront del pH per al mutant W221A s'obtenen els dos pK_a cinètics per a l'enzim lliure i per al complex enzim substrat (figura 6.21), que es recullen a la taula 6.5, juntament amb els resultats obtinguts per a l'enzim salvatge en un altre perfil de pH realitzat en paral·lel.

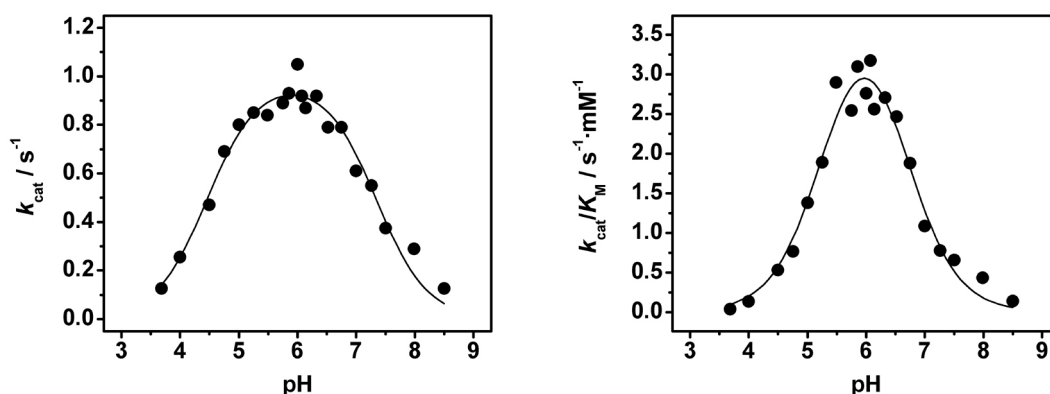


Figura 6.21. Perfils d'activitat enfront del pH del mutant W221A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* fent servir com a substrat el G4G3G-MU. En el gràfic de l'esquerra es representa el paràmetre cinètic k_{cat} enfront del pH, i en el de la dreta el paràmetre k_{cat}/K_M enfront del pH. Les cinètiques es realitzen en tampó 11 mM fosfat, 0.1 mM $CaCl_2$, $I = 0.1$ M, a 30 °C.

Taula 6.5. Valors del pK_a cinètics obtinguts a partir dels perfils de pH realitzats a 30 °C per al mutant W221A i l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Enzim i pK_a cinètic	Enzim lliure	Complex enzim-substrat
W221A		
pK_a 1	5.29 ± 0.09	4.46 ± 0.06
pK_a 2	6.65 ± 0.09	7.34 ± 0.06
wt		
pK_a 1	5.04 ± 0.09	4.3 ± 0.2
pK_a 2	7.3 ± 0.1	7.5 ± 0.2

En els dos enzims, el fet de formar el complex enzim-substrat provoca un eixamplament del perfil d'activitat enfront del pH que resulta més acusat en el cas del mutant W221A. Avaluant els efectes causats per l'eliminació del residu Trp221 en el mutant W221A sobre els pK_a cinètics de la 1,3-1,4- β -glucanasa es comprova que el canvi per al residu que actua d'àcid general, al voltant de 0.15 unitats de pK_a , és mínim en el cas del complex enzim-substrat. A més, l'efecte produït és l'esperat, una disminució en el pK_a del residu que actua d'àcid general en eliminar un grup hidrofòbic situat al seu costat. Aquesta disminució de pK_a és molt més marcada en el perfil de pH de l'enzim lliure, en què es produeix una disminució de 0.65 unitats de pK_a . D'aquesta manera es confirma el paper d'aquest residu hidrofòbic situat al costat del residu que actua d'àcid general, no només en el correcte posicionament de l'àcid general per tal d'exercir la seva funció catalítica, sinó també exercint un paper clau en la modulació del seu pK_a . L'efecte de la mutació sobre el pK_a del residu que actua com a nucleòfil en l'enzim lliure no queda tan clar, i és possible que no es tracti d'una influència directa, sinó que es transmeti a través de la xarxa de ponts d'hidrogen del centre actiu, potser com a conseqüència del canvi de pK_a del residu que actua com a àcid general. A la figura 6.22 es mostra a nivell comparatiu els perfils d'activitat enfront del pH de l'enzim salvatge (en línia contínua), i del mutant W221A (en línia puntejada).

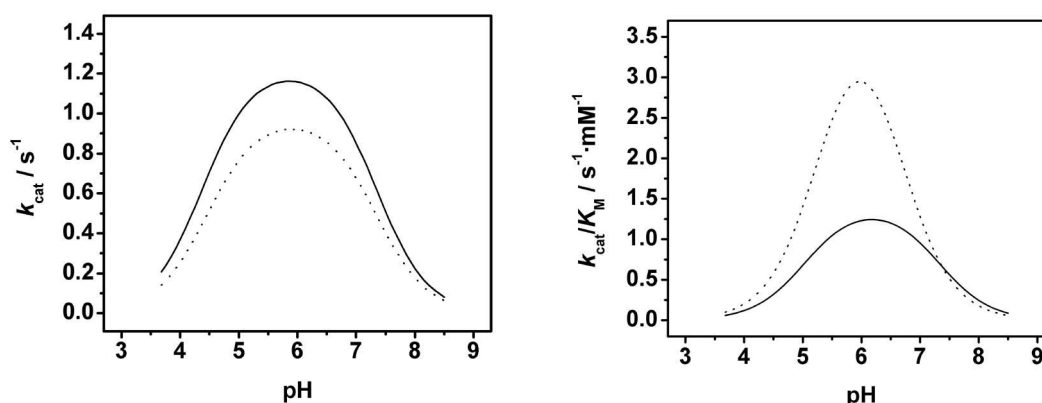


Figura 6.22. Perfils d'activitat enfront del pH de l'enzim salvatge (línia contínua) i del mutant W221A (línia puntejada) de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, fent servir com a substrat el G4G3G-MU. En el gràfic de l'esquerra es representa el paràmetre cinètic k_{cat} enfront del pH, i en el de la dreta el paràmetre k_{cat}/K_M enfront del pH. Les cinètiques es realitzen en tampó 11 mM fosfat, 0.1 mM $CaCl_2$, $I = 0.1$ M, a 30 °C.

Així com el perfil de k_{cat} enfront del pH és molt similar per als dos enzims, tant a nivell de $\text{p}K_{\text{a}}$ com d'activitat enzimàtica, el perfil de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ permet observar un gran augment d'eficiència catalítica per al mutant W221A als pH de màxima activitat. Donat que els valors de k_{cat} són similars per als dos enzims, aquest canvi d'eficiència catalítica es deu bàsicament a una millora molt significativa en la unió de substrat en el cas del mutant.

6.4.4.2. *Anàlisis de Hammett dels mutants W221A i W221F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de Bacillus licheniformis*

L'estudi de la influència del triptòfan 221 en el mecanisme de reacció es realitza a través d'un anàlisis de Hammett dels mutants W221A i W221F, fent servir els mateixos substrats utilitzats amb l'enzim salvatge. Les cinètiques amb els mutants es realitzen a les mateixes condicions experimentals emprades per a l'enzim salvatge, per tal de poder-les comparar. En l'estudi del mutant W221A s'inclou també el substrat G4G3G-4BrP, del que se'n disposa d'una petita quantitat. Els paràmetres cinètics obtinguts en els ajusts de les equacions de Michaelis-Menten, amb o sense inhibició acompetitiva per substrat, a les cinètiques de reacció per al mutant W221A de la 1,3-1,4- β -glucanasa es presenten a la taula 6.6.

Taula 6.6. Paràmetres cinètics del mutant W221A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* obtinguts en l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten amb o sense inhibició acompetitiva per substrat a les cinètiques realitzades amb una família d'aril *O*- β -D-trisacàrids d'estructura bàsica G4G3G-X. Les reaccions s'han dut a terme en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2 i a 30 °C.

Substrat	$\text{p}K_{\text{a}}$ aglicona	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	K_{M} / mM	K_{I} / mM	$(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}) / \text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
G4G3G-P	9.99	0.042 ± 0.003	3.6 ± 0.5	----	0.012 ± 0.002
G4G3G-4BrP	9.34	0.056 ± 0.001	0.46 ± 0.03	----	0.13 ± 0.01
G4G3G-3NP	8.39	0.372 ± 0.004	1.16 ± 0.04	----	0.32 ± 0.01
G4G3G-MU	7.5	0.56 ± 0.01	0.83 ± 0.04	13 ± 1	0.68 ± 0.05
G4G3G-4NP	7.18	0.54 ± 0.02	0.37 ± 0.03	----	1.5 ± 0.2
G4G3G-4NP	7.18	0.623 ± 0.006	0.40 ± 0.01	----	1.56 ± 0.05
G4G3G-3,5DNP	6.69	4.71 ± 0.06	0.63 ± 0.02	----	7.5 ± 0.4
G4G3G-3,4DNP	5.36	9.5 ± 0.4	0.31 ± 0.02	7 ± 2	30 ± 3
G4G3G-3,4DNP	5.36	9.37 ± 0.08	0.196 ± 0.006	----	48 ± 2
G4G3G-2,3DNP	4.96	20.9 ± 0.3	0.37 ± 0.02	----	57 ± 3
G4G3G-2,3DNP	4.96	23.1 ± 0.2	0.32 ± 0.01	----	72 ± 3
G4G3G-2,4DNP	3.96	21.2 ± 0.8	0.037 ± 0.004	----	573 ± 84
G4G3G-2,4DNP	3.96	18.7 ± 0.3	0.030 ± 0.001	----	630 ± 40

La representació gràfica del logaritme dels paràmetres cinètics k_{cat} i $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ enfront del $\text{p}K_{\text{a}}$ per al mutant W221A es mostren a la figura 6.23. D'entrada ja es pot veure que amb aquest mutant no es reproduïx el comportament bifàsic observat per als substrats menys activats en el cas de l'enzim salvatge. En aquest cas es comprova que, tret del resultat obtingut per al substrat més activat, en què s'hauria pogut arribar a assolir la velocitat de l'etapa de desglicosidació, el logaritme del paràmetre cinètic k_{cat} per a la resta de substrats defineix una recta de pendent -0.49 enfront del $\text{p}K_{\text{a}}$. Tanmateix, per

tal de poder assegurar que la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat per als substrats més activats s'hauria de disposar de més resultats per a substrats amb aglicones de pK_a inferior a 4.96. A la figura 6.23 es mostren els dos ajusts que es poden realitzar: en una línia contínua es representa l'ajust considerant que per al substrat més activat s'ha assolit la velocitat de reacció de l'etapa de desglicosidació, i l'ajust en línia puntejada considera que encara no s'ha assolit la velocitat de l'etapa de desglicosidació. Els resultats representats en el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M s'ajusten a una recta de pendent -0.73 , cosa que indica, que a l'estat de transició de l'etapa de glicosidació es dona un grau important de desenvolupament de càrrega sobre l'oxigen de l'enllaç que s'escindeix. La diferència entre els pendents obtinguts en els dos gràfics de Hammett podria explicar-se en base a un augment progressiu de la contribució de la velocitat de desglicosidació en el valor final de la velocitat de reacció en disminuir el pK_a de l'aglicona, com correspondria si la desglicosidació fos, com a mínim parcialment, determinant de la velocitat de reacció.

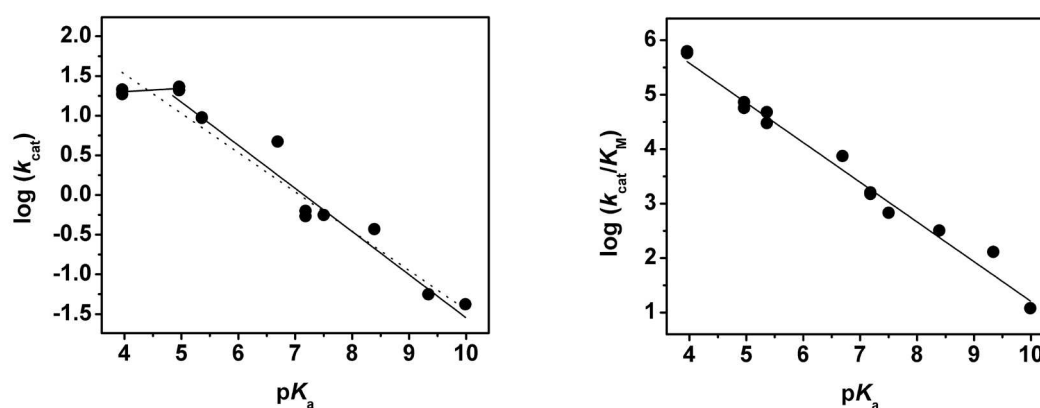


Figura 6.23. Anàlisi de Hammett en k_{cat} i k_{cat}/K_M del mutant W221A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb una família d'aril *O*- β -D-trisacàrids d'estructura bàsica G4G3G-X, a 30 °C i pH 7.2. En els gràfics es representa el logaritme del paràmetre k_{cat} enfront del pK_a de l'aglicona (esquerra) i el logaritme del paràmetre k_{cat}/K_M enfront del pK_a de l'aglicona (dreta).

El mutant W221F representa una estructura intermèdia entre l'enzim salvatge i el mutant W221A. En aquest mutant, si bé s'ha eliminat el triptòfan, aquest s'ha substituït per un altre residu aromàtic, de manera que no s'ha perdut totalment l'entorn hidrofòbic al voltant del residu àcid general, i alhora encara es conserva una superfície amb la que el substrat podria fer interaccions d'apilament hidrofòbic. Amb aquest mutant també s'ha realitzat una anàlisi de Hammett, i els valors dels paràmetres cinètics obtinguts en els ajusts de les equacions de Michaelis-Menten, amb o sense inhibició acompetitiva per substrat, es presenten a la taula 6.7. Les representacions de les anàlisis de Hammett corresponents es mostren a la figura 6.24.

El gràfic de Hammett en k_{cat} per al mutant W221F presenta una elevada dispersió dels resultats, tot i així l'ajust d'una línia recta als resultats proporciona un pendent de -0.48 . En el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M els valors del logaritme del paràmetre k_{cat}/K_M enfront del pH presenten menys dispersió de resultats, cosa que indica que la dispersió observada en el gràfic de Hammett en k_{cat} no es genera com a conseqüència de l'etapa d'unió del substrat, i l'ajust lineal rendeix un pendent de -0.73 , que indica un desenvolupament de càrrega elevat en l'estat de transició per a l'etapa de glicosidació.

És possible que de la mateixa manera que es proposa en el cas del mutant W221A, per al mutant W221F també s'hagi arribat a assolir la velocitat de l'etapa de desglicosidació per als substrats més reactius, però l'elevada dispersió dels resultats recomana certa precaució a l'hora d'ajustar un gràfic bifàsic. Parant atenció al gràfic de Hammett en k_{cat} , cal esmentar que els tres resultats que cauen per sota de l'ajust lineal corresponen a cinètiques en què s'ha ajustat inhibició acompetitiva per substrat. Aquest és precisament un dels tres motius que generen dispersió en una anàlisi de Hammett en k_{cat} , dificultant la determinació correcta d'aquest paràmetre, i rendint resultats generalment inferiors. El que és cert, és que el pendent del gràfic de Hammett en k_{cat} és inferior a l'obtingut en el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M , i que tant l'efecte de la inhibició, com l'efecte d'assolir velocitats properes a la de l'etapa de desglicosidació per als substrats més activats, en podrien ser la causa.

Taula 6.7. Paràmetres cinètics del mutant W221F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* obtinguts en l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten, amb o sense inhibició acompetitiva per substrat, a les cinètiques realitzades amb una família d'aril *O*- β -D-trisacàrids d'estructura bàsica G4G3G-X. Les reaccions s'han dut a terme en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 7.2 i a 30 °C.

Substrat	pK _a aglicona	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	K_M / mM	K_I / mM	$(k_{\text{cat}}/K_M) / \text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
G4G3G-P	9.99	0.07 ± 0.005	3.9 ± 0.5	108 ± 66	0.018 ± 0.004
G4G3G-3NP	8.39	0.590 ± 0.006	0.84 ± 0.03	----	0.70 ± 0.04
G4G3G-MU	7.5	0.389 ± 0.009	0.39 ± 0.02	9.4 ± 0.7	1.00 ± 0.08
G4G3G-4NP	7.18	0.62 ± 0.01	0.25 ± 0.01	29 ± 5	2.5 ± 0.2
G4G3G-4NP	7.18	0.675 ± 0.009	0.27 ± 0.01	----	2.5 ± 0.1
G4G3G-3,5DNP	6.69	7.09 ± 0.06	0.36 ± 0.01	----	19.6 ± 0.8
G4G3G-3,4DNP	5.36	9.3 ± 0.2	0.15 ± 0.01	----	62 ± 4
G4G3G-2,3DNP	4.96	35.1 ± 0.8	0.25 ± 0.02	----	143 ± 12
G4G3G-2,4DNP	3.96	32 ± 4	0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.06	470 ± 140

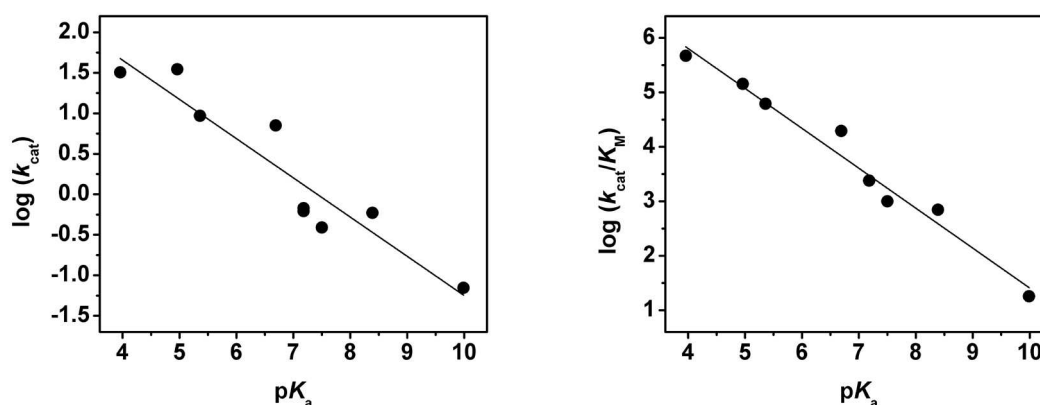


Figura 6.24. Anàlisi de Hammett en k_{cat} i k_{cat}/K_M del mutant W221F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb una família d'aril *O*- β -D-trisacàrids d'estructura bàsica G4G3G-X, a 30 °C i pH 7.2. En els gràfics es representa el logaritme del paràmetre k_{cat} enfront del pK_a de l'aglicona (esquerra) i el logaritme del paràmetre k_{cat}/K_M enfront del pK_a de l'aglicona (dreta).

6.4.5. Cinètiques en estat preestacionari del mutant W221A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Donat que el comportament bifàsic de l'anàlisi de Hammett en k_{cat} per a l'enzim salvatge s'explica en base a un mecanisme en dues branques, en concordança amb el mecanisme proposat pels estudis en estat preestacionari, la desaparició del comportament bifàsic en els mutants en la posició 221 suggereix un canvi de mecanisme, en el sentit que aquest tingui lloc a través d'un mecanisme lineal bàsic de retenció de configuració. Per tal d'estudiar aquesta opció es realitzen cinètiques en estat preestacionari amb el mutant W221A. Per a aquest mutant, si el mecanisme és lineal no s'hauria de veure una fase d'acumulació de producte en fer servir com a substrat el G4G3G-MU (**18**), a diferència del que s'hauria de veure amb el G4G3G-2,4DNP (**28**), cas que per a aquest substrat la desglicosidació hagués passat a ser determinant de la velocitat de reacció.

Les reaccions s'han realitzat a les mateixes condicions emprades per a l'enzim salvatge, és a dir, en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fofat, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.2 i 30 °C. En tots els casos s'observa una cinètica molt similar a l'obtinguda amb l'enzim salvatge, en què després d'una primera fase de retardament, es dona una fase d'acumulació de producte. Els resultats de k_{obs} i la quantitat d'aglicona alliberada per unitat d'enzim a la fase d'acumulació es presenten a la taula 6.8.

Taula 6.8. Resultats de les cinètiques en estat preestacionari del mutant W221A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb els substrats G4G3G-2,4DNP (**28**), G4G3G-3,4DNP (**21**) i G4G3G-MU (**18**). Les cinètiques s'han dut a terme en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fofat, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.2, 30 °C, [W221A] = 1.79 μ M (per als substrats **18** i **28**) i 8.9 μ M (per al substrat **21**). A la taula es presenten el valor de la k_{obs} i la quantitat d'aglicona alliberada per unitat d'enzim, a cada concentració de substrat.

G4G3G-2,4DNP			G4G3G-3,4DNP			G4G3G-MU		
[S] /mM	k_{obs} / s^{-1}	$\Delta P/[E]_0$	[S] /mM	k_{obs} / s^{-1}	$\Delta P/[E]_0$	[S] /mM	k_{obs} / s^{-1}	$\Delta P/[E]_0$
1.26	54 \pm 2	4.58	1.05	64 \pm 2	1.94	4.70	65 \pm 8	0.106
0.63	56 \pm 2	4.73	0.70	62 \pm 2	1.50	2.35	74 \pm 8	0.106
0.32	69 \pm 3	3.91	0.52	59 \pm 2	1.34	1.17	75 \pm 7	0.089
0.16	62 \pm 3	1.94	0.35	83 \pm 3	0.90	0.59	80 \pm 8	0.073
0.08	63 \pm 2	1.24	0.26	59 \pm 2	0.61	0.29	64 \pm 10	0.056
0.04	48 \pm 4	0.79	0.13	51 \pm 2	0.39	0.15	73 \pm 12	0.034
0.02	22 \pm 3	0.47	0.07	56 \pm 2	0.26	0.07	17 \pm 7	0.022
0.01	10 \pm 2	0.22	0.03	58 \pm 2	0.14			

D'entrada el fet que s'observi la fase d'acumulació de producte en totes les cinètiques, independentment del substrat emprat, ja no quadra amb els resultats obtinguts en l'anàlisi de Hammett en k_{cat} per a un mecanisme lineal de retenció de configuració. Els resultats indiquen, a l'igual que en el cas de l'enzim salvatge, que la constant de velocitat associada a la fase d'acumulació de producte no mostra gaire dependència de la concentració de substrat, tret de les concentracions de substrat més baixes, en què s'observa una tendència a disminuir. En quant a l'amplitud de la fase d'acumulació es

comprova que en el cas del substrat més reactiu la quantitat d'aglicona alliberada per a la concentració de substrat més elevada és més de quatre vegades superior a la concentració d'enzim emprada, cosa que indica un mecanisme ramificat. Finalment, la relació de les constants cinètiques de segon ordre, k_{cat}/K_M , inicial i d'estat estacionari (anterior i posterior a la fase d'acumulació) apunta al mateix mecanisme proposat per a l'enzim salvatge, que es torna a mostrar a la figura 6.25 prescindint de les possibles etapes d'inhibició acompetitiva per substrat.

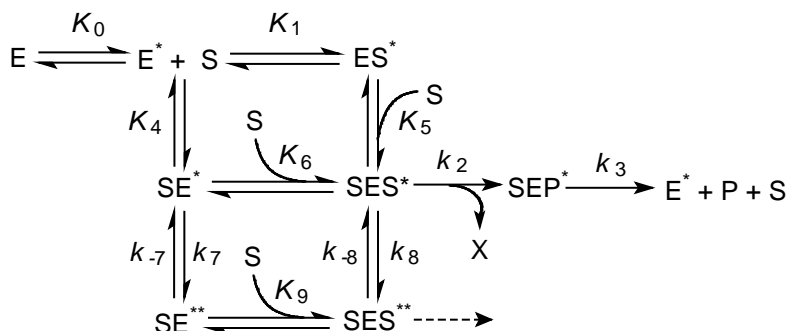


Figura 6.25. Mecanisme proposat per a l'enzim salvatge i el mutant W221A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a partir dels resultats obtinguts en les cinètiques en estat preestacionari.

Si bé no ha estat possible establir el valor del canvi conformacional K_8 per dificultats en determinar correctament el valor del paràmetre cinètic k_{cat} inicial (previ a la fase d'acumulació), s'ha pogut fer una aproximació dels valors de la constant K_7 a partir dels valors de la k_{cat}/K_M . Els resultats, que a l'igual que en el cas de l'enzim salvatge, estan relacionats amb la reactivitat dels substrats es presenten a la taula 6.9.

Taula 6.9. Constant d'equilibri per al canvi conformacional de l'espècie SE^* en funció del substrat emprat en les cinètiques. Condicions experimentals: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl_2 , pH 7.2 i 30 °C. $K_7 = k_7/k_{-7}$.

Substrat	K_7
G4G3G-2,4DNP	4
G4G3G-3,4DNP	5
G4G3G-MU	10

Les cinètiques en estat preestacionari del mutant W221A (així com d'altres realitzades amb un mutant hiperactiu de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, el mutant M58A) fan pensar que el mecanisme proposat per a l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* és un mecanisme general que no es veu pertorbat per mutacions puntuals en residus del centre actiu. De manera que, tot i que els resultats de les anàlisis de Hammett dels mutants W221A i W221F s'expliquin amb facilitat fent servir un mecanisme bàsic de retenció de configuració, s'han d'interpretar prenent com a model el mecanisme ramificat proposat.

6.4.6. Interpretació de les anàlisis de Hammett per als mutants W221A i W221F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en base a un mecanisme ramificat

La interpretació de les anàlisis de Hammett dels mutants W221A i W221F a partir del mecanisme ramificat de la figura 6.25, es pot realitzar en base a dos premisses diferents, en funció de si es considera que la segona branca presenta una activitat enzimàtica significativa o no. I en el cas de considerar que la segona branca sigui activa, s'han de determinar les condicions que s'haurien d'acomplir per tal d'obtenir uns gràfics de Hammett lineals.

En el primer cas, considerant que la segona branca presenta una activitat pràcticament nul·la, l'anàlisi de Hammett només representa l'activitat que té lloc a través d'una única branca de reacció. Aquest mecanisme, en estat estacionari, es comportaria com un mecanisme lineal en què el canvi conformacional no suposaria més que una etapa d'inhibició. Com a conseqüència les anàlisis de Hammett que s'obtidrien encaixarien perfectament amb el mecanisme bàsic de retenció de configuració.

En el cas que la segona branca també presenti activitat catalítica, i aquesta sigui significativa, per tal de poder tenir anàlisis de Hammett d'acord amb el mecanisme bàsic de retenció de configuració l'etapa determinant de la velocitat de reacció ha de ser la mateixa per a les dues branques. Suposant que l'etapa determinant és l'etapa de glicosidació, com sembla que és el cas, es poden donar encara dues opcions. O bé les dues branques actives presenten un grau de desenvolupament de càrrega similar, de manera que les possibles variacions en la constant d'equilibri del canvi conformacional passen inadvertides; o si es donen graus de desenvolupament de càrrega diferents en les dues etapes de glicosidació, la constant d'equilibri del canvi conformacional ha de ser independent del substrat, de manera que els gràfics de Hammett presentin per a tots els substrats la mateixa mitjana entre el grau de desenvolupament de càrrega generat en les dues branques.

S'han considerat les dues opcions en el cas particular del mutant W221A, que dels dos mutants estudiats, és l'enzim per al què es disposa de més resultats.

D'acord amb la primera opció, que implica una activitat pràcticament inexistent en la segona branca, s'ha de plantejar el perquè d'aquesta eliminació de l'activitat de la segona branca en el cas del mutant. Es pot donar una explicació d'aquesta pèrdua d'activitat en base al perfil de pH del mutant W221A en k_{cat}/K_M . Així, al pH de treball la proporció d'enzim lliure que es troba en la forma ionitzada correcta per tal d'efectuar la catàlisi és molt baixa, ja que el pK_a que s'atribueix al residu que actua com a àcid general és de 6.65, i les cinètiques es realitzen a pH 7.2. En no disposar de cap avaluació sobre el grau de desenvolupament de càrrega que hauria de tenir el mutant en la segona branca si fos actiu, es pot suposar que la tendència és la mateixa que en l'enzim salvatge, amb un desenvolupament de càrrega molt inferior per a la segona branca, possiblement degut a un major requeriment de catàlisi àcida. D'aquesta manera, una disminució del pK_a del residu que actua com a àcid general, com la que es dona en el mutant W221A, afectaria molt més la segona branca que no pas la primera, en què la necessitat de protonació no és tan elevada, disminuint d'aquesta manera la importància que pugui tenir la catàlisi efectuada per la segona branca en el total de la reacció enzimàtica. Tanmateix, és possible que els efectes de la mutació no es vegin tan

reflectits en l'etapa catalítica, ja que el perfil de pH del complex enzim-substrat per al mutant W221A i l'enzim salvatge són molt similars, sinó més aviat en les etapes anteriors d'unió i canvi conformacional que afecten la K_M , que és on s'ha observat un canvi més important en el comportament del mutant respecte de l'enzim salvatge. També es podria donar el cas que la unió de substrat al mutant un cop s'hagi produït el canvi conformacional condueixi a un complex abortiu o un complex amb molt poca activitat catalítica per un posicionament incorrecte del mateix.

Pel que fa a l'opció que la segona branca presenti una activitat enzimàtica significativa, en el cas de l'enzim W221A es pot descartar l'opció que el canvi conformacional no sigui dependent de l'estructura electrònica del substrat, ja que s'ha comprovat que la constant de canvi conformacional K_7 augmenta en disminuir la reactivitat del substrat. Per tant, només es pot proposar l'opció que les dues branques tinguin un grau de desenvolupament de càrrega similar a l'etapa de glicosidació, de forma que la variació en K_7 no comporti un canvi de pendent apreciable.

A partir dels exemples descrits en la bibliografia (veure apèndix 3) es comprova que no hi ha una relació clara entre els canvis d'activitat enzimàtica, o canvis en els perfils de pH, i les variacions a nivell de mecanisme, i això fa que no es puguin predir, a priori, els efectes de les mutacions sobre el mecanisme enzimàtic. Amb això present, si bé s'han proposat dues explicacions per a les anàlisis de Hammett dels mutants en el triptòfan 221, en base al mecanisme observat per a la 1,3-1,4- β -glucanasa, sense disposar de més informació, no es pot discernir quina d'elles és la correcta.

6.4.7. Comparació de les anàlisis de Hammett entre els mutants W221F i W221A i l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

A la taula 6.10 es presenta un resum dels pendents obtinguts en les diferents anàlisis de Hammett de l'enzim salvatge i els mutants W221A i W221F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Per a l'enzim salvatge s'inclouen els dos possibles ajusts per a l'anàlisi de Hammett en k_{cat}/K_M en funció de si es considera monofàsic o bifàsic.

Taula 6.10. Resum dels pendents obtinguts en les diferents anàlisis de Hammett de l'enzim salvatge i dels mutants W221A i W221F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Per a cada enzim s'indica el nombre de fases que es poden diferenciar en les gràfiques; per a l'anàlisi de Hammett en k_{cat}/K_M per a l'enzim salvatge s'inclouen els dos possibles ajusts: monofàsic i bifàsic. Condicions experimentals: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl_2 , pH 7.2 i 30 °C.

	Hammett en k_{cat}		Hammett en k_{cat}/K_M			
	fases	pendent	fases	pendent	fases	pendent
Enzim salvatge	2	-0.87 -0.09	1	-0.77	2	-1 -0.44
W221A	1	-0.49	1	-0.73	---	----
W221F	1	-0.48	1	-0.73	---	----

Les anàlisis de Hammett dels mutants W221A i W221F s'assemblen molt, generant el mateix pendent en el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M i molt similar en el gràfic de Hammett en k_{cat} , tot i que només en el cas del mutant W221A l'ajust s'ha realitzat considerant que la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció per al G4G3G-2,4DNP (**28**). En tots dos casos, les anàlisis de Hammett entren dins dels resultats normals en una glicosidasa que actua amb retenció de configuració, amb un gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M lineal, representatiu de l'etapa de glicosidació en què es dona un grau de desenvolupament de càrrega elevat. De fet, si es considera que l'anàlisi de Hammett en k_{cat}/K_M per a l'enzim salvatge també és monofàsica, el pendent obtingut és molt similar als anteriors, indicant un desenvolupament de càrrega a l'estat de transició del mateix ordre per a l'etapa de glicosidació en tots tres enzims. Les diferències més significatives entre l'enzim salvatge i els dos mutants queden reflectides en les anàlisis de Hammett en k_{cat} , i no només en el fet que per als mutants deixin de ser bifàsiques, sinó també en el valor del pendent obtingut. Per als mutants aquest pendent és inferior al de l'anàlisi de Hammett en k_{cat}/K_M , apuntant a una desglicosidació parcialment determinant de la velocitat de reacció, mentre que per a l'enzim salvatge el pendent de l'anàlisi de Hammett en k_{cat} és inclús superior al de l'anàlisi de Hammett en k_{cat}/K_M . Aquests resultats suggereixen que si bé la mutació del triptòfan 221 no sembla afectar significativament a l'etapa de glicosidació, si que ho fa a la de desglicosidació, amb una caiguda important en la velocitat de reacció d'aquesta etapa. Aquest fenomen queda reflectit a la taula 6.11 en què es resumeixen els valors de k_{cat} obtinguts per als tres enzims amb els diferents substrats. S'observa que per als substrats de pK_a intermedi les velocitats de reacció són similars, però que per als substrats més reactius la velocitat augmenta molt en el cas de l'enzim salvatge mentre que es queda estancada en el cas dels mutants.

Taula 6.11. Compendi dels resultats del paràmetre cinètic k_{cat} per a les reaccions de l'enzim salvatge i els mutants W221F i W221A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb diferents substrats cromofòrics. Condicions experimentals: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl_2 , pH 7.2 i 30 °C.

Substrat	pK_a aglicona	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$		
		wt	W221F	W221A
G4G3G-P	9.99	0.46 ± 0.03	0.07 ± 0.005	0.042 ± 0.003
G4G3G-4BrP	9.34	----	----	0.056 ± 0.001
G4G3G-3NP	8.39	0.85 ± 0.01	0.590 ± 0.006	0.372 ± 0.004
G4G3G-MU	7.50	0.75 ± 0.02	0.389 ± 0.009	0.56 ± 0.01
G4G3G-4NP	7.18	0.81 ± 0.02	0.65 ± 0.02	0.58 ± 0.03
G4G3G-3,5DNP	6.69	4.9 ± 0.3	7.09 ± 0.06	4.71 ± 0.06
G4G3G-3,4DNP	5.36	16.5 ± 0.4	9.3 ± 0.2	9.4 ± 0.5
G4G3G-2,3DNP	4.96	272 ± 6	35.1 ± 0.8	22.0 ± 0.5
G4G3G-2,4DNP	3.96	590 ± 14	32 ± 4	20 ± 1

Si bé una comparació de pendents entre les anàlisis de Hammett en k_{cat}/K_M apunta a una etapa de glicosidació sense gaires canvis, es poden extreure conclusions més acurades fent servir una correlació dels resultats obtinguts amb els diferents substrats. Donat que una bona correlació entre els $\log(k_{\text{cat}}/K_M)$ de dos enzims permet proposar la similitud entre els seus centres actius [486, 487], una comparació similar entre un enzim salvatge i algun dels seus mutants dona informació sobre l'efecte de la mutació en l'estructura

del centre actiu a l'estat de transició per a l'etapa de glicosidació. La comparació dels logaritmes de k_{cat}/K_M dels mutants respecte al logaritme del mateix paràmetre cinètic de l'enzim salvatge proporciona gràfics bifàsics (figura 6.26), que indiquen que es dona un canvi de mecanisme per als quatre substrats amb valors de k_{cat}/K_M inferiors. A mode de comparació a la mateixa figura es mostra en tots dos gràfics el que significaria una correlació lineal amb una recta puntejada. Aquests gràfics de correlació semblen indicar que per a l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* el millor ajust per al gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M és un ajust bifàsic, tot i que a priori no sembli necessari. En el cas dels dos mutants es comprova que per als substrats de major reactivitat el grau de desenvolupament de càrrega en l'enzim salvatge és superior que en el cas dels mutants (amb pendents en els gràfics de la figura 6.26 de 0.73 i $r^2 = 0.98$ per al mutant W221A i de 0.47 i $r^2 = 0.96$ per al mutant W221F), mentre que per als substrats menys reactius el desenvolupament de càrrega és superior en els dos mutants que no pas en l'enzim salvatge (amb pendents de 1.67 i $r^2 = 0.98$ per al mutant W221A i de 1.66 i $r^2 = 0.99$ per al mutant W221F). Les bones correlacions observades amb els dos mutants per als dos grups de substrats per separat indiquen una estructura d'estat de transició similar en els tres enzims, però el fet que es puguin realitzar dues correlacions diferents per a cada parell d'enzims indica que a cada grup de substrats es dona un estat de transició amb un desenvolupament de càrrega molt diferent. De fet, els resultats de les correlacions quadren amb el fet que en el cas dels mutants l'estructura de l'estat de transició de l'etapa de glicosidació sigui el mateix per a tots els substrats (una única branca activa) o molt similar (dues etapes de glicosidació amb un desenvolupament de càrrega parell), de manera que els diferents valors de correlació venen donats pels diferents graus de desenvolupament de càrrega observats amb l'enzim salvatge a l'etapa de glicosidació. Per tant, aquest enfocament dels resultats que tendeix a agrupar els substrats en dos grups, amb dos estats de transició diferents per a l'etapa de glicosidació, confirma la presència de dues activitats enzimàtiques diferents, que ja es fan notar a la primera etapa catalítica.

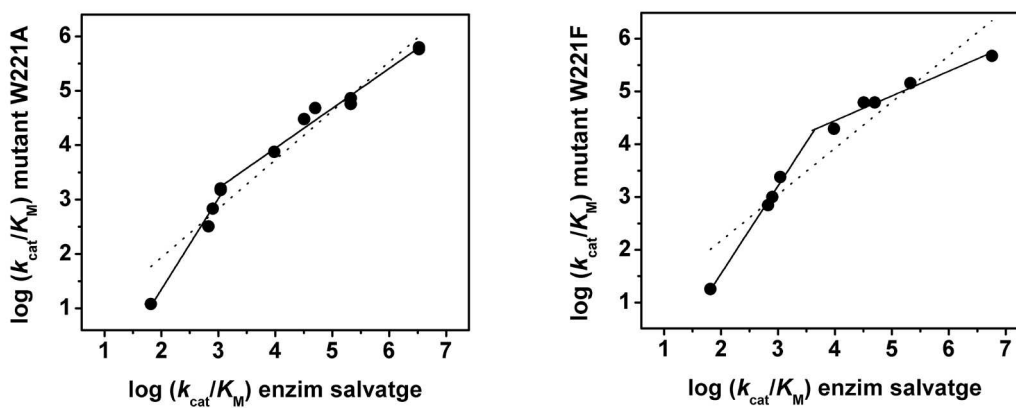


Figura 6.26. Comparació dels logaritmes del paràmetre cinètic k_{cat}/K_M del mutant W221A (esquerra) i W221F (dreta) enfront del logaritme del mateix paràmetre per a l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Les cinètiques s'han realitzat amb una família d'aril *O*- β -D-trisacàrids d'estructura bàsica G4G3G-X, a 30 °C i pH 7.2.

Una comparació similar efectuada sobre els logaritmes del paràmetre cinètic k_{cat} (figura 6.27) fa encara més evident el canvi de pendent per als quatre substrats menys reactius.

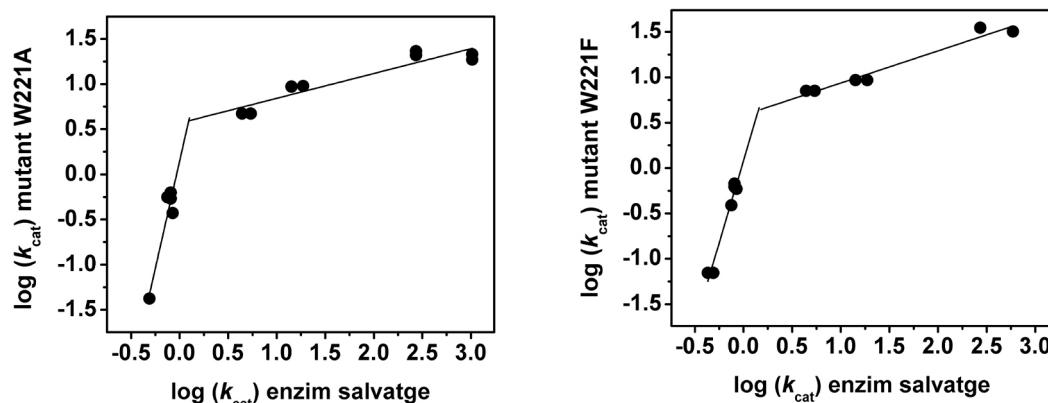


Figura 6.27. Comparació dels logaritmes del paràmetre cinètic k_{cat} del mutant W221A (esquerra) i W221F (dreta) enfront del logaritme del mateix paràmetre per a l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Les cinètiques s'han realitzat amb una família d'aril *O*- β -D-trisacàrids d'estructura bàsica G4G3G-X, a 30 °C i pH 7.2.

Així doncs, tant els resultats de les cinètiques en estat preestacionari del mutant W221A com l'aspecte de les correlacions entre l'enzim salvatge i els mutants ratifiquen la presència d'aquesta segona branca amb activitat enzimàtica (com a mínim a l'enzim salvatge) que es fa rellevant des del punt de vista cinètic per als substrats de $pK_a \geq 7.5$.

6.5. Estudi mecanístic de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814

Donat que l'anàlisi de Hammett de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* se surt del comportament més comunament observat en glicosidases, es va optar per realitzar en paral·lel l'anàlisi de Hammett d'una altra glicosidasa que hauria de tenir un comportament més ortodox. Veient el gran nombre de glicosidases de la família 1 que estan caracteritzades, i aprofitant la col·laboració amb l'Institut de Biologia Fonamental "Vicent Villar Palasí" de la Universitat Autònoma de Barcelona, en què s'estava realitzant la caracterització d'una β -glucosidasa de *Streptomyces* pertanyent a la família 1, es va decidir realitzar una anàlisi de Hammett d'aquest enzim. A tal efecte s'ha realitzat l'expressió i purificació, a escala de mg, d'una β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 recombinant, a la que se li ha afegit una cua d'histidines per tal de facilitar el procés de purificació (veure capítol d'expressió i purificació enzimàtica); i s'han sintetitzat els substrats necessaris per tal de realitzar l'estudi (capítol de síntesi de substrats).

6.5.1. Caracterització cinètica de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814

Abans de realitzar les anàlisis de Hammett amb la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 s'han realitzat un perfil de pH i un de temperatura de l'enzim salvatge per tal de determinar les seves condicions d'estabilitat i activitat màxima. En els dos estudis s'ha fet servir com a substrat el 4'-nitrofenil β -D-glucopirànòsid, i així com la temperatura triada per tal de realitzar el perfil de pH és de 40 °C, el perfil de temperatura s'ha realitzat al pH al que s'ha obtingut el màxim d'activitat enzimàtica.

6.5.1.1. *Perfil d'activitat enfront del pH*

S'ha realitzat un perfil de pH de l'activitat de la β -glucosidasa de *Streptomyces* en tampó fosfat 50 mM, I = 0.15 M i 40 °C, fent servir com a substrat el G-4NP i mesurant en continu de l'absorbància del 4-nitrofenol alliberat al llarg del temps. Els paràmetres cinètics obtinguts a cada pH es recullen a la taula 6.12 i es representen a la figura 6.28.

Taula 6.12. Paràmetres cinètics de la hidròlisi del 4'-nitrofenil β -D-glucopiranosid per part de la β -glucosidasa de *Streptomyces* a diferents pH. Condicions experimentals: tampó fosfat 50 mM, I = 0.15 M, 40 °C.

pH	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_{\text{M}} / \mu\text{M}$	K_{I} / mM	$(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}) / \text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$
4.55	14 ± 2	210 ± 46	1.5 ± 0.6	67 ± 23
5.0	10.7 ± 0.4	85 ± 8	2.8 ± 0.5	125 ± 17
5.5	11.8 ± 0.8	88 ± 1	1.7 ± 0.4	133 ± 11
6.0	17.7 ± 0.9	146 ± 13	0.87 ± 0.09	121 ± 17
6.25	23 ± 2	174 ± 27	0.8 ± 0.1	129 ± 32
6.5	23 ± 2	218 ± 34	0.6 ± 0.1	106 ± 27
6.75	20 ± 1	147 ± 20	0.9 ± 0.2	134 ± 28
7.0	15.0 ± 0.9	129 ± 16	1.4 ± 0.2	117 ± 22
7.5	8.1 ± 0.1	149 ± 34	1.7 ± 0.6	55 ± 19
8.05	5.6 ± 0.6	199 ± 36	2.4 ± 0.9	28 ± 8

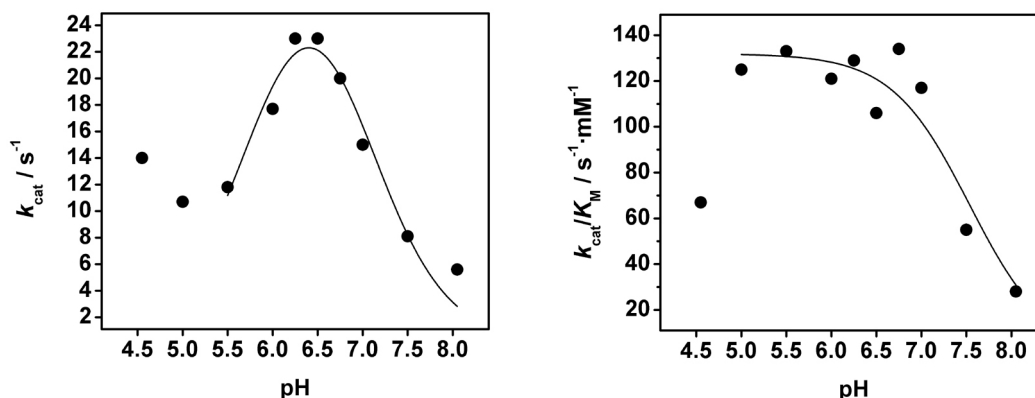


Figura 6.28. Perfils d'activitat enfront del pH de la β -glucosidasa de *Streptomyces*. Esquerra: perfil del paràmetre k_{cat} enfront del pH, dreta: perfil del paràmetre $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ enfront del pH. Condicions experimentals: tampó fosfat 50 mM, I = 0.15 M, 40 °C.

Si bé a pH àcids el comportament de la β -glucosidasa és una mica anòmal, els resultats obtinguts a $\text{pH} \geq 5.5$ permeten realitzar un ajust prou acurat del perfil de pH de l'enzim tant en k_{cat} com en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$. Els pK_{a} cinètics obtinguts en els ajusts per a l'enzim lliure (a partir dels valors de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) i per al complex enzim-substrat (a partir dels valors de k_{cat}) es recullen a la taula 6.13.

Taula 6.13. Valors de pK_a cinètics per a l'enzim lliure i per al complex enzim-substrat per a la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814.

	Enzim lliure	Complex de Michaelis
pK_{a1}	-----	5.79
pK_{a2}	7.52	7.03

En el cas de l'enzim lliure només es pot ajustar el pK_a cinètic atribuïble al residu que fa el paper d'àcid general, que és de 7.52, ja que a pH àcid no es disposa de suficients resultats com per definir una bona corba de Gauss. Per al complex enzim-substrat si que s'han pogut definir els pK_a atribuïbles als dos residus catalítics, que són de 5.79 i de 7.03, ara bé el pK_a a pH àcids s'ha ajustat prescindint dels resultats a pH 4.5 i 5, de manera que es tracta només d'un resultat aproximat. Es comprova doncs, que a 40 °C la β -glucosidasa de *Streptomyces* presenta el seu màxim d'activitat a l'entorn de pH 6.5, i que d'acord amb la gran majoria de glicosidasas, el pK_a que s'atribueix al residu que actua com a àcid general disminueix en formar-se el complex enzim-substrat.

6.5.1.2. Perfil d'activitat enfront de la temperatura

El perfil d'activitat enfront de temperatura s'ha realitzat a pH 6.5, que és el pH en què s'ha observat el màxim en l'eficiència catalítica de la β -glucosidasa a 40 °C, i a una única concentració de substrat de 588 μ M, que correspon al màxim d'activitat a 40 °C i pH 6.5. La reacció s'ha seguit en continu mesurant l'absorbància del 4-nitrofenol a 400 nm, els resultats obtinguts es mostren a la taula 6.14. La representació del logaritme de $v_0/[E]_0$ enfront de l'invers de la temperatura es presenta en la figura 6.29.

Taula 6.14. Velocitat de reacció de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 a diferents temperatures. Es mostren també les $\Delta\varepsilon$ emprades per a la determinació de la velocitat d'alliberament de 4-nitrofenol en cada cas. Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat pH 6.5, I = 0.15 M, [G-4NP] = 588 μ M, [wt] = 5.6 nM.

Temperatura / °C	$\Delta\varepsilon / M^{-1}\cdot cm^{-1}$	$(v_0/[E]_0) / s^{-1}$
30	4804	3.63
40	5130	7.27
45	5243	10.40
50	5464	12.52
55	5719	15.54
60	6004	16.77
70	6747	2.41
80	7175	1.87

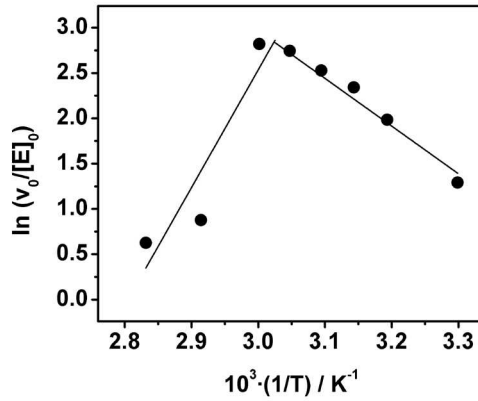


Figura 6.29. Representació del logaritme de $v_0/[E]_0$ enfront de l'invers de la temperatura de reacció per a la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 enfront d'una dissolució 588 μM de 4'-nitrofenil β -D-glucopiranosid a pH 6.5.

A partir dels resultats obtinguts s'observa que la temperatura òptima és de 57.5 °C, ja que a 60 °C la inactivació enzimàtica ja es fa palesa. Aquest fet s'observa tant en el gràfic de la figura 6.29, com en les cinètiques de reacció, en què a aquesta temperatura s'observa una pèrdua de linealitat de la velocitat inicial abans dels deu minuts de reacció, cosa que no succeeix a temperatures inferiors i és indicativa de la pèrdua d'activitat enzimàtica.

Com el perfil de temperatura s'ha realitzat a la concentració de substrat en què l'activitat és màxima es pot aproximar el valor del paràmetre cinètic k_{cat} al del quocient $v_0/[E]_0$. Per tant, a partir de l'ajust del $\ln v_0/[E]_0$ enfront de $1/T$ per a temperatures inferiors a 55 °C, es poden obtenir els valors de l'energia d'activació (E_a) i el valor del logaritme de la constant d'Arrhenius (A) fent servir l'equació d'Arrhenius linealitzada (equació 6.9): $E_a = 11.5 \pm 0.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ i $\ln A = 21 \pm 1$.

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R \cdot T} \quad \text{Equació 6.9.}$$

Aplicant les equacions 6.10 i 6.11 a partir dels valors d'aquests termes cinètics poden obtenir-se en els paràmetres termodinàmics d'activació ΔH^\ddagger i ΔS^\ddagger per a la reacció catalitzada per la β -glucosidasa: $\Delta H^\ddagger = 10.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ i $\Delta S^\ddagger = -18.9 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. Aquests valors indiquen que tant els factors entàlpics com els entròpics contribueixen a l'increment de l'energia d'activació de Gibbs, amb domini de la contribució entàlpica a temperatura ambient.

$$E_a = \Delta H^\ddagger + R \cdot T \quad \text{Equació 6.10.}$$

$$A = \frac{k_B \cdot T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R} + 1\right) \quad \text{Equació 6.11.}$$

6.5.2. Anàlisi de Hammett de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814

Les condicions experimentals que s'han escollit per tal de realitzar l'anàlisi de Hammett són de tampó fosfat 50 mM a pH 6.5, que és el pH al que s'ha observat el màxim en l'eficiència catalítica de l'enzim, i a una temperatura de 30 °C, en què l'enzim és estable i mostra una activitat acceptable, i d'altra banda, la hidròlisi espontània dels substrats encara no és significativa. Degut a la senzilla accessibilitat tant a l'enzim com als substrats, totes les cinètiques de l'enzim salvatge amb els diferents aril β -D-glucopirànòsids s'han realitzat per duplicat. Els paràmetres cinètics obtinguts en els ajusts es presenten a la taula 6.15.

Taula 6.15. Paràmetres cinètics obtinguts en l'ajust del model de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat a les cinètiques de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 amb una família d'aril β -D-glucopirànòsids amb diferents aglicones, en tampó 50 mM fosfat, pH 6.5 a 30 °C.

Substrat	pK_a aglicona	k_{cat} / s^{-1}	$K_M / \mu M$	K_I / mM	$(k_{cat}/K_M) / mM^{-1} \cdot s^{-1}$
G-P	9.99	0.70 ± 0.06	2070 ± 280	11 ± 2	0.34 ± 0.07
G-P	9.99	0.6 ± 0.1	2610 ± 750	21 ± 13	0.2 ± 0.1
G-4BrP	9.34	3.3 ± 0.1	461 ± 30	29 ± 11	7.2 ± 0.7
G-4BrP	9.34	3.3 ± 0.1	472 ± 33	27 ± 10	7.1 ± 0.7
G-3NP	8.39	15 ± 2	234 ± 52	1.2 ± 0.4	64 ± 22
G-3NP	8.39	16 ± 2	251 ± 51	1.1 ± 0.3	64 ± 21
G-MU	7.53	13.4 ± 0.4	61 ± 4	4.1 ± 0.7	220 ± 21
G-MU	7.53	10.1 ± 0.3	54 ± 5	5 ± 1	187 ± 23
G-2NP	7.22	8 ± 1	20 ± 4	0.18 ± 0.05	497 ± 136
G-2NP	7.22	8 ± 3	25 ± 17	0.2 ± 0.1	300 ± 300
G-4NP	7.18	9.4 ± 0.5	116 ± 11	1.0 ± 0.1	81 ± 12
G-4NP	7.18	6.9 ± 0.3	91 ± 8	1.3 ± 0.1	76 ± 11
G-3,5DNP	6.69	23.0 ± 0.6	63 ± 4	10 ± 3	363 ± 34
G-3,5DNP	6.69	18.0 ± 0.8	45 ± 6	12 ± 5	399 ± 70
G-3,4DNP	5.36	21 ± 1	77 ± 10	2.2 ± 0.6	277 ± 53
G-3,4DNP	5.36	15.1 ± 0.4	50 ± 4	4.2 ± 0.7	302 ± 32
G-2,3DNP	4.96	12.7 ± 0.8	18 ± 2	2 ± 2	707 ± 134
G-2,3DNP	4.96	10.6 ± 0.7	12 ± 2	2 ± 1	862 ± 200
G-2,4DNP	3.96	28 ± 1	9.8 ± 0.8	0.18 ± 0.02	2828 ± 358
G-2,4DNP	3.96	33 ± 1	6.1 ± 0.5	0.33 ± 0.05	5435 ± 593

El model que millor s'ajusta als resultats obtinguts és el de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat, excepte en el cas del 2'-nitrofenil β -D-glucopirànòsid, en què l'ajust d'aquesta equació és clarament molt pobre, fent-se evident que la cinètica de reacció descriu un comportament en què s'observen dues activitats enzimàtiques (figura 6.30).

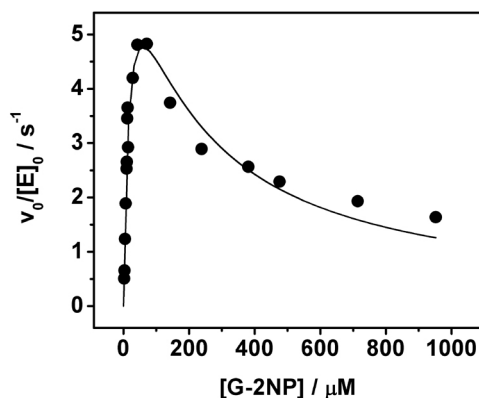
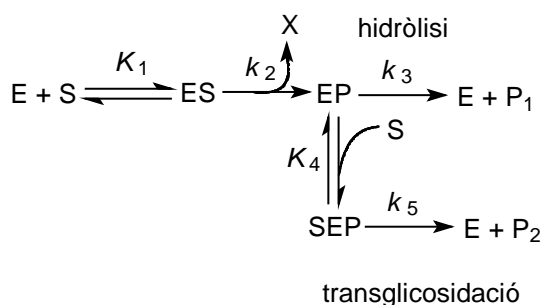


Figura 6.30. Cinètica d'hidròlisi del 2'-nitrofenil β -D-glucopiranosid per acció de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 en tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, 30 °C. En el gràfic es representa la $v_0/[E]_0$ enfront de la concentració de substrat. En una línia contínua es mostra l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat.

De fet, aquest comportament tampoc és tan estrany, ja que s'ha descrit que la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 presenta activitat transglicosidasa [488, 489]. Quan se segueix una cinètica de reacció mesurant l'alliberament de l'aglicona, l'activitat transglicosidasa pot passar inadvertida o fer-se clarament palesa de dues maneres, o bé amb un augment de la velocitat d'hidròlisi a elevades concentracions de substrat més enllà de la velocitat de saturació, que es dona quan la velocitat de transglicosidació és superior a la velocitat de desglicosidació, o bé com una inhibició que no arriba a abolir totalment l'activitat enzimàtica, quan la velocitat de transglicosidació és inferior a la velocitat de desglicosidació (equacions 6.13 i 6.14 de la figura 6.31). A la figura 6.32 es mostren dos ajusts diferents per als resultats obtinguts en la hidròlisi del 2'-nitrofenil β -D-glucopiranosid. La línia puntejada correspon a l'ajust del model de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat, mentre que la línia contínua correspon a l'ajust d'un model en què la glicosidasa que actua amb retenció de configuració presenta activitat hidrolítica i activitat de transglicosidació (figura 6.31). Tot i que l'ajust del model que inclou transglicosidació és molt més reeixit que no el d'inhibició acompetitiva, els paràmetres cinètics obtinguts continuen tenint uns errors d'ajust molt elevats, i donat que els paràmetres $k_{cat,1}$ i K_M són del mateix ordre de magnitud que els obtinguts amb el model amb inhibició acompetitiva, a la taula es recullen els valors obtinguts amb l'ajust d'inhibició acompetitiva per tal d'homogeneïtzar criteris.



$$\frac{v_0}{[E]_0} = \frac{k_{cat,1} \cdot [S] + k_{cat,2} \cdot [S]^2}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}}$$

Equació 6.12.

On considerant que l'etapa de formació del complex ternari està en equilibri :

$$k_{cat,1} = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3}$$

Equació 6.13.

$$k_{cat,2} = \frac{k_2 \cdot k_5}{k_2 + k_3} \cdot \frac{1}{K_4}$$

Equació 6.14.

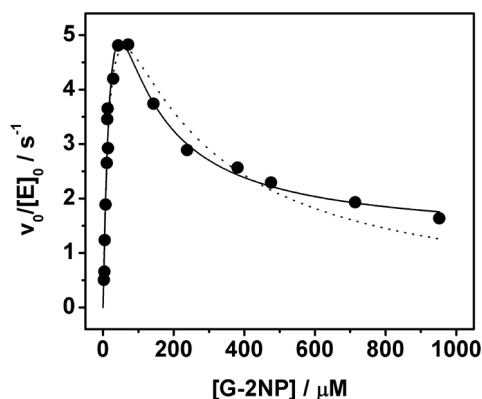
$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot \frac{k_3}{k_2 + k_3}$$

Equació 6.15.

$$K_I = \frac{k_2 + k_3}{k_2} \cdot K_4$$

Equació 6.16.

Figura 6.31. Mecanisme d'acció d'una glicosidasa que actua amb retenció de configuració i que presenta tant activitat hidrolítica com activitat de transglicosidació, i equació de velocitat associada. A les equacions 6.13-6.16 es mostra la definició dels diferents paràmetres cinètics. Un tret característic de les anàlisis de Hammett en què la desglicosidació és determinant de la velocitat de reacció és la disminució del valor de la K_M en augmentar la reactivitat del substrat. L'explicació d'aquest fet rau en la pròpia definició de la constant K_M (equació 6.15), que només s'identifica amb la constant de dissociació del complex enzim-substrat si la velocitat de l'etapa de glicosidació (k_2) és molt inferior a la velocitat de l'etapa de desglicosidació (k_3) i, per tant, limitant de la velocitat de reacció. En aquests casos els valors de la K_M dels diferents substrats solen ser del mateix ordre de magnitud i els canvis generalment reflecteixen els efectes estèrics en la unió del substrat. Quan la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció el valor de la K_M s'allunya del valor de la constant de dissociació real del complex enzim-substrat, i disminueix en augmentar la reactivitat del substrat.



Paràmetres cinètics de l'ajust de l'equació 6.12 als resultats obtinguts amb el G-2NP:

$$k_{cat,1} = 12 \pm 4 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{cat,2} = 0.03 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$$

$$K_M = 37 \pm 17 \text{ μM}$$

$$K_I = 0.02 \pm 0.01 \text{ μM}$$

Figura 6.32. Cinètica d'hidròlisi del 2'-nitrofenil β-D-glucopiranosid per acció de la β-glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 en tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, 30 °C. En el gràfic es representa la $v_0/[E]_0$ enfront de la concentració de substrat. En una línia contínua es mostra l'ajust de l'equació corresponent al model amb dues branques que comporta les activitats d'hidròlisi i transglicosidació, i en línia puntejada l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat.

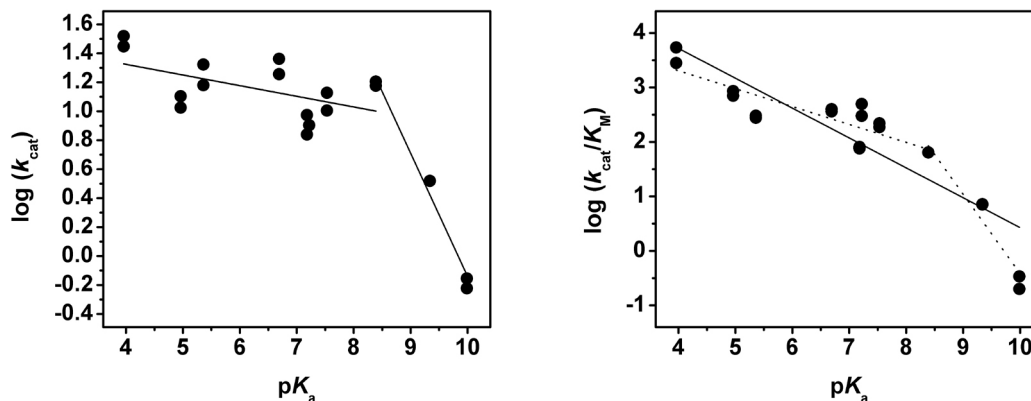


Figura 6.33. Anàlisi de Hammett en k_{cat} i en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 amb una família d'aril β -D-glucopirànòsids en tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, 30 °C. En els gràfics es representa el logaritme de k_{cat} (esquerra) i de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (dreta) respecte del $\text{p}K_{\text{a}}$ de l'aglicona.

A partir dels paràmetres cinètics s'obtenen els gràfics de Hammett en k_{cat} i en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 (figura 6.33). El gràfic en k_{cat} és clarament bifàsic, de manera que per als substrats que tenen aglicones de $\text{p}K_{\text{a}}$ superior a 8 el pendent és de -0.85 , mentre que per a la resta de substrats el pendent és de -0.07 . Aquest canvi de pendent és indicatiu d'un canvi en l'etapa determinant de la velocitat de reacció, així per als substrats que tenen aglicones de $\text{p}K_{\text{a}}$ inferior a 8, la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció, mentre que per a la resta podria ser-ho la glicosidació, i en aquest cas s'observaria un elevat grau de desenvolupament de càrrega a l'estat de transició. En el gràfic es comprova que la velocitat d'hidròlisi del substrat més activat, el 2',4'-dinitrofenil β -D-glucopirànòsid, és clarament superior a la resta de substrats per als que la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció. De fet, si no s'inclou en l'ajust el resultat corresponent a aquest substrat, el pendent del gràfic de Hammett en k_{cat} per als substrats més activats passa a ser de -0.02 , és a dir pràcticament nul, que és més coherent amb el que seria d'esperar si la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció.

Pel que fa a aquest plus d'activitat observat en el cas del 2',4'-dinitrofenil β -D-glucopirànòsid, després de descartar que aquest augment de velocitat sigui degut a la hidròlisi espontània del substrat, es planteja la possibilitat que amb aquest substrat s'observi hidròlisi de superfície (hidròlisi espontània catalitzada per la superfície enzimàtica). Per tal d'estudiar aquesta opció s'han realitzat cinètiques a les mateixes condicions experimentals utilitzades en les anàlisis de Hammett però en aquest cas s'ha substituït l'enzim salvatge de la β -glucosidasa, per un mutant inactiu, el E383A, que és un mutant en el residu que actua com a nucleòfil. S'ha comprovat que fent servir la mateixa concentració d'enzim emprada per realitzar l'anàlisi de Hammett, la velocitat d'hidròlisi del substrat és del mateix ordre de magnitud que la seva hidròlisi espontània. Aquest resultat descarta la catàlisi superficial per part de l'enzim com a responsable de l'augment de velocitat observat amb aquest substrat. Una altra possibilitat que no es pot descartar és la contribució que pot aportar la velocitat de transglicosidació a la velocitat total d'alliberament de 2,4-dinitrofenol, que en definitiva és el que es mesura. S'ha de tenir present, que per a un enzim que transglicosida, aquesta segona activitat està sempre present en competència amb la desglicosidació. Això no vol dir que l'etapa de transglicosidació hagi de tenir la mateixa velocitat amb tots els substrats sintètics, ni el

mateix pes en la velocitat final que es mesura per a l'enzim. Parant atenció al mecanisme de la figura 6.31, s'observa que la transglicosidació comporta, d'una banda, la unió d'una segona molècula de substrat al centre actiu, i de l'altra, una etapa catalítica. I l'efecte que tingui l'estructura del substrat sobre aquests dos paràmetres no té per què ser el mateix, ni anar en la mateixa direcció. El que sí que guarda més relació és el pes que té l'etapa de transglicosidació amb l'activitat catalítica de l'enzim. Així doncs, com més ràpida és la velocitat de glicosidació enfront de la de desglicosidació, més intermedi de reacció s'acumula, i com l'intermedi és el producte de partida de la reacció de transglicosidació, més afavorida es veu aquesta. A la taula 6.15 es pot observar com hi ha una certa tendència a una disminució de la K_I com millor és el substrat (pK_a de l'aglicona més àcid), tot i així no és un efecte uniforme, indicant que quelcom diferent de l'estructura electrònica del substrat, possiblement factors estèrics, també afecten l'activitat transglicosidasa. No es pot descartar, per tant, que en el cas del 2',4'-dinitrofenil β -D-glucopiranosid, que és el substrat per al que la velocitat de glicosidació és major, la contribució en catàlisi deguda a l'etapa de transglicosidació sigui prou important com per a marcar una diferència respecte de la resta de substrats en la velocitat d'alliberament de l'aglicona.

En el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M la dispersió dels resultats no permet una distinció clara entre un ajust lineal o bifàsic (figura 6.33), ja que tant ajustant una única recta als resultats, com amb un ajust bifàsic deixant de banda els dos substrats amb aglicones de major pK_a , la correlació és de l'ordre de 0.75-0.80. En el gràfic de la figura 6.33 es mostren les dues possibilitats. Ajustant una única recta, el pendent del gràfic és de -0.55 , i es fa força evident que el punt corresponent al fenil β -D-glucopiranosid queda molt per sota del valor esperat, possiblement degut a un efecte estèric en la unió o al fet que en no poder generar cap interacció per pont d'hidrogen en el subjeti +1 l'orientació del substrat respecte dels residus catalítics sigui diferent a la de la resta de substrats. En un ajust bifàsic, el pendent per als substrats més activats és de -0.33 , mentre que els valors del logaritme de k_{cat}/K_M per als tres substrats menys reactius defineix una recta de pendent -1.46 respecte dels pK_a de les seves aglicones. Degut a l'elevat valor del pendent per a aquests darrers substrats, que no és compatible amb la hidròlisi de β -glucòsids, pren força l'ajust lineal. El pendent de -0.55 (o de -0.41 si no es té en compte el valor de k_{cat}/K_M per al fenil β -D-glucopiranosid) indica una etapa de glicosidació amb un desenvolupament de càrrega discret a l'estat de transició. Aquest resultat no concorda amb l'obtingut en l'anàlisi de Hammett en k_{cat} , on el pendent per als substrats menys reactius és de -0.85 , cosa que fa pensar que per a aquests substrats la glicosidació no sigui l'etapa determinant de la velocitat de reacció, sinó que una altra etapa diferent de les dues etapes catalítiques pròpiament dites sigui la que determini el valor de k_{cat} . Per a aquests dos substrats, el G-4BrP i el G-P, que no poden establir ponts d'hidrogen amb cap residu del subjeti +1, i que per contra podrien fixar millor l'aglicona a través d'interaccions de van der Waals, es podria proposar que l'etapa d'alliberament d'aglicona passi a ser determinant de la velocitat de reacció.

6.5.3. Anàlisi de Hammett del mutant C181A de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814

La cisteïna 181 és un residu neutre situat a l'entrada del centre actiu de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 que, d'una forma similar al triptòfan 221 de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, estableix interaccions de van der Waals amb l'aglicona. Prèviament al present treball s'havia observat que en eliminar aquest residu en el mutant C181A disminueix en gran mesura la inhibició per substrat que s'observa en les cinètiques de l'enzim salvatge amb el 4'-nitrofenil β -D-glucopirànòsid (figura 6.34). És a dir, que tant la cisteïna 181 en la β -glucosidasa com el triptòfan 221 en la β -glucanasa juguen papers importants en la unió de substrats, que es tradueixen en canvis significatius ja sigui en el paràmetre K_M o en la constant d'inhibició K_I . S'ha realitzat una anàlisi de Hammett del mutant C181A de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814, substituint la cisteïna per una alanina per tal de determinar si, en aquest cas, la mutació del residu neutre que interacciona amb el substrat en el subseti +1 introdueix algun canvi significatiu a nivell mecanístic.

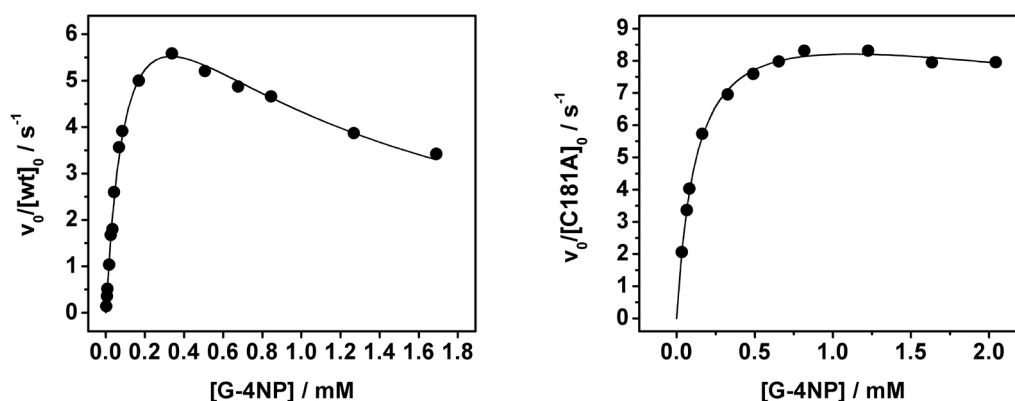


Figura 6.34. Cinètiques d'hidròlisi del 4'-nitrofenil β -D-glucopirànòsid per acció de l'enzim salvatge (esquerra) i el mutant C181A (dreta) de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 en tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, 30 °C. En el gràfic es representa la $v_0/[E]_0$ enfront de la concentració de substrat.

Per tal de realitzar l'anàlisi de Hammett s'ha hagut d'expressar i purificar el mutant C181A de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 a nivell de mg, tal i com s'explica al capítol d'expressió i purificació enzimàtica. Les cinètiques s'han realitzat a les mateixes condicions emprades per a l'enzim salvatge, tampó 50 mM fosfat, pH 6.5 a 30 °C, per tal de poder comparar posteriorment els resultats. Així com en el cas de la β -glucosidasa salvatge ha estat necessari ajustar l'equació de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per a tots els substrats, en el cas del mutant C181A aquest ajust només ha estat necessari en el cas dels substrats 2'-nitrofenil- i 4'-nitrofenil β -D-glucopirànòsids, ja que per a la resta de substrats no s'observa inhibició. Els paràmetres cinètics ajustats a les diferents cinètiques es mostren a la taula 6.16.

Taula 6.16. Paràmetres cinètics obtinguts en l'ajust del model de Michaelis-Menten a les cinètiques del mutant C181A de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 amb una família d'aril β -D-glucopirànòsids amb diferents aglicones, en tampó 50 mM fosfat, pH 6.5 a 30 °C. Només en el cas dels substrats G-2NP i G-4NP ha estat necessari realitzar l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten tenint en compte la inhibició acompetitiva per substrat.

Substrat	pK_a aglicona	k_{cat} / s^{-1}	$K_M / \mu M$	K_I / mM	$(k_{cat}/K_M) / mM^{-1} \cdot s^{-1}$
G-P	9.99	1.30 ± 0.07	2705 ± 360	----	0.48 ± 0.09
G-4BrP	9.34	10.3 ± 0.1	411 ± 12	----	25 ± 1
G-3NP	8.39	14.9 ± 0.3	131 ± 10	----	114 ± 11
G-MU	7.53	10.49 ± 0.08	95 ± 3	----	110 ± 4
G-2NP	7.22	14.0 ± 0.5	25 ± 2	1.1 ± 0.2	560 ± 65
G-4NP	7.18	10.1 ± 0.2	126 ± 7	10 ± 2	80 ± 6
G-3,5DNP	6.69	18.9 ± 0.2	59 ± 3	----	320 ± 20
G-3,4DNP	5.36	15.2 ± 0.1	34 ± 1	----	447 ± 16
G-2,3DNP	4.96	26.8 ± 0.5	12 ± 1	----	2233 ± 228
G-2,4DNP	3.96	47.9 ± 0.7	9.0 ± 0.6	----	5322 ± 433

A la figura 6.35 es presenten els gràfics de Hammett en k_{cat} i k_{cat}/K_M obtinguts a partir dels paràmetres cinètics ajustats en el cas del mutant C181A de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814. Malgrat que a simple vista sembli que en els dos gràfics s'està reflectint la mateixa etapa, la interpretació d'aquests gràfics és diferent. El gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M , amb un pendent de -0.53 si s'ajusten tots els punts, i de -0.40 si no es té en compte el punt corresponent al fenil β -D-glucopirànòsid, indiquen que no hi ha gaire desenvolupament de càrrega a l'etapa de glicosidació. De forma similar al que s'ha observat amb l'enzim salvatge, el punt corresponent al pK_a del fenol cau molt per sota de la recta, segurament com a conseqüència d'alguna diferència en l'etapa d'unió. D'altra banda, en el gràfic de Hammett en k_{cat} , que no mostra els efectes que es puguin donar en l'etapa de formació del complex de Michaelis, el fet que el punt corresponent al fenil β -D-glucopirànòsid se situï molt per sota de l'ajust lineal efectuat amb la resta de substrats, s'interpreta com que per a aquest substrat bé la glicosidació, bé l'alliberament de l'aglicona, és l'etapa determinant de la velocitat de reacció, mentre que probablement per a la resta de substrats la k_{cat} reflecteix bàsicament l'etapa de desglicosidació. Una altra vegada, de forma similar al que s'observa amb l'enzim salvatge, la k_{cat} corresponent al substrat més activat, el 2',4'-dinitrofenil β -D-glucopirànòsid se situa per sobre de l'ajust lineal, i s'observa una tendència a un augment de k_{cat} en augmentar la reactivitat del substrat que rendeix un pendent de -0.11 (obviant el punt corresponent al fenil β -D-glucopirànòsid). L'explicació dels resultats és la mateixa que s'ha donat en el cas de l'enzim salvatge, i aquesta aportació addicional en velocitat que fa que, per a aquells substrats en què la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció, el pendent del gràfic de Hammett en k_{cat} no sigui nul, és la contribució de l'etapa de transglicosidació.

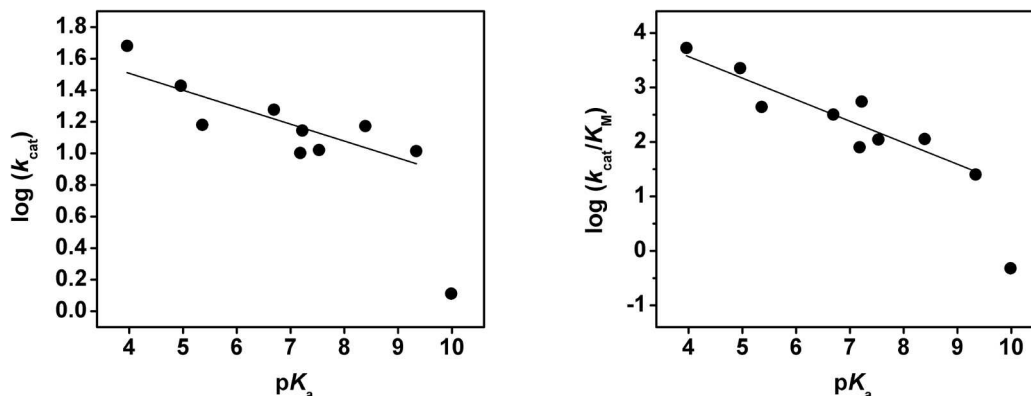


Figura 6.35. Anàlisi de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M del mutant C181A de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 amb una família d'aril β -D-glucopiranosids en tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, 30 °C. En els gràfics es representa el logaritme de k_{cat} (esquerra) i de k_{cat}/K_M (dreta) respecte del pK_a de l'aglicona.

A molts efectes, sembla que l'eliminació de la cisteïna 181 no produeix canvis significatius en el mecanisme d'acció de la β -glucosidasa. Sent molt generosos es pot aventurar un canvi en el punt d'inflexió en el gràfic de Hammett en k_{cat} , però la dispersió dels resultats obtinguts amb el mutant tampoc permet assegurar-ho amb claredat. Pel que fa a l'efecte de la mutació sobre l'etapa de glicosidació en el gràfic comparatiu del logaritme de k_{cat}/K_M dels dos enzims s'observa un ajust lineal dels resultats dels dos enzims amb un pendent de 0.97 i una correlació de 0.95 (figura 6.36). Això indica l'elevada similitud de l'estructura de l'estat de transició en el cas dels dos enzims, i també, que sigui quin sigui el motiu que fa que el resultat de $\log(k_{\text{cat}}/K_M)$ per al fenil β -D-glucopiranosid s'aparti de la linealitat en els gràfics de Hammett en k_{cat}/K_M , és el mateix per als dos enzims.

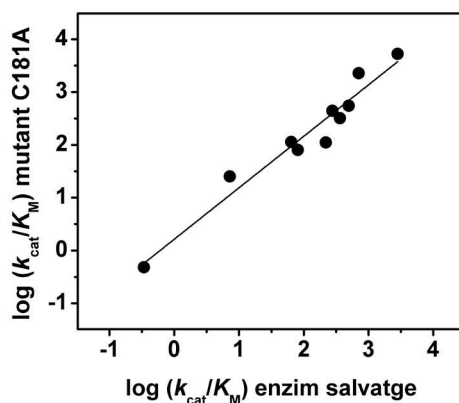
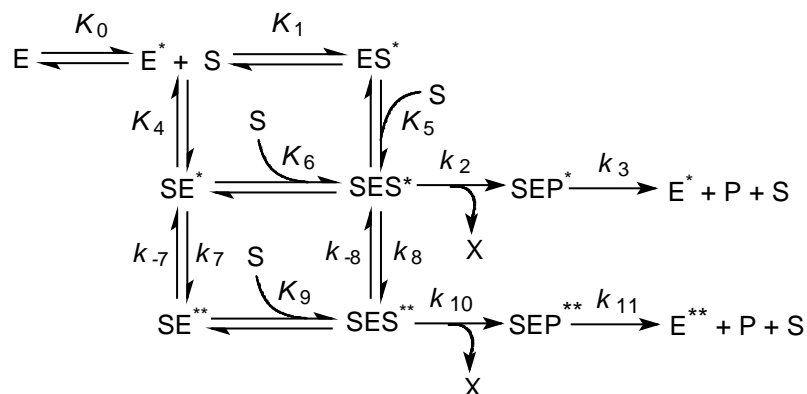


Figura 6.36. Relació entre el logaritme del paràmetre k_{cat}/K_M del mutant C181A i l'enzim salvatge de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 enfront d'una família d'aril β -D-glucopiranosids. Condicions de reacció: tampó 50 mM fosfat, pH 6.5, 30 °C.

6.6. Conclusions

6.6.1. 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

➤ Les anàlisis de Hammett de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* s'expliquen en base al següent mecanisme ramificat amb dues espècies enzimàtiques actives, en què la segona branca pren rellevància a nivell cinètic per als substrats de $pK_a \geq 7.5$:



➤ A partir dels pendents de l'anàlisi de Hammett en k_{cat}/K_M es proposa que el grau de desenvolupament de càrrega en l'estat de transició per a l'etapa de glicosidació de la primera branca és molt important, amb una protonació pràcticament nul·la (pendent de -1), mentre que per a l'etapa de glicosidació de la segona branca és bastant més moderat (pendent de -0.44).

➤ El gràfic de Hammett en k_{cat} de l'enzim salvatge indica que mentre que per a la primera branca l'etapa determinant de la velocitat de reacció és l'etapa de glicosidació, per a la segona branca ho és la de desglicosidació.

➤ Les anàlisis de Hammett de l'enzim salvatge a diferents pH indiquen un canvi de mecanisme a pH àcids (possiblement a $pH < 6$), que es pot concretar en base a un canvi d'etapa determinant de la velocitat de reacció, o bé en un canvi en la importància relativa de les dues branques actives.

➤ La mutació W221A comporta una disminució del pK_a assignat al residu que actua com a àcid general de 0.65 unitats de pK_a per a l'enzim lliure i de 0.15 unitats de pK_a en el complex enzim-substrat, confirmant el paper del triptòfan 221 en la modulació del pK_a del residu que actua com a àcid general.

➤ Les anàlisis de Hammett dels mutants W221A i W221F són molt similars i mostren el comportament estàndard per a una glicosidasa que actua amb retenció de configuració. Els pendents de -0.73 per al gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M indiquen un elevat grau de desenvolupament de càrrega en l'estat de transició de l'etapa de glicosidació. La disminució del valor del pendent en els gràfics de Hammett en k_{cat} (pendent ≈ -0.5) respecte del pendent en les anàlisis en k_{cat}/K_M s'interpreta en base a una etapa de desglicosidació parcialment determinant de la velocitat de reacció.

➤ Els resultats de les cinètiques en estat preestacionari per al mutant W221A amb els substrats G4G3G-MU (**18**), G4G3G-3,4DNP (**21**) i G4G3G-2,4DNP (**28**) indiquen que aquest mutant presenta un mecanisme ramificat igual que l'enzim salvatge.

➤ La interpretació de les anàlisis de Hammett del W221A en base al mecanisme ramificat proposat també per a l'enzim salvatge permeten plantejar dues hipòtesis: o bé la segona branca d'aquest mecanisme no presenta una activitat enzimàtica significativa, o bé l'estructura de l'estat de transició de l'etapa de glicosidació és la mateixa per a les dues branques.

6.6.2. β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814

➤ La β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 presenta el seu màxim d'activitat en la hidròlisi del substrat 4'-nitrofenil β -D-glucopiranosid al voltant pH 6.5 i 57.5 °C. Els pK_a cinètics de l'enzim en la hidròlisi del mateix substrat són de 5.79 i 7.03 per al complex de Michaelis i de 7.52 per a l'enzim lliure. La reacció transcorre amb una $E_a = 11.5 \pm 0.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, i amb $\Delta H^\ddagger = 10.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ i $\Delta S^\ddagger = -18.9 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, indicant que tant el factor entàlpic com entròpic contribueixen a l'augment de l'energia lliure de Gibbs d'activació.

➤ L'anàlisi de Hammett en k_{cat}/K_M de la β -glucosidasa salvatge amb un pendent de -0.41 indica que el desenvolupament de càrrega a l'estat de transició de l'etapa de glicosidació només és moderat. L'anàlisi de Hammett en k_{cat} indica que per als substrats que tenen aglicones amb pK_a inferior a 8 la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció.

➤ L'anàlisi de Hammett en k_{cat}/K_M del mutant C181A de la β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. QM-B814 amb un pendent de -0.40 indica un desenvolupament de càrrega moderat en l'estat de transició de l'etapa de glicosidació. A partir de l'anàlisi de Hammett en k_{cat} del mutant es proposa que per a tots els substrats tret del fenil β -D-glucopiranosid la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció.

➤ La mutació C181A no introdueix cap modificació significativa en l'estructura de l'estat de transició de l'etapa de glicosidació.

➤ L'augment de velocitat de reacció del substrat 2',4'-dinitrofenil β -D-glucopiranosid respecte de la resta de substrats amb tots dos enzims possiblement indica que per a aquest substrat la velocitat de l'etapa de transglicosidació és del mateix ordre de magnitud que el de l'etapa de desglicosidació.

➤ El fet que per al substrat fenil β -D-glucopiranosid tant la k_{cat} com la k_{cat}/K_M siguin inferiors a l'esperat amb tots dos enzims pot indicar que per a aquest substrat l'etapa de formació del complex de Michaelis i la d'alliberament d'aglicona són més lentes que no pas les etapes catalítiques.

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

7.1. Mecanisme catalític proposat per a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

El mecanisme proposat per a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* aglutina els resultats obtinguts en els diferents experiments per tal d'obtenir una visió global del seu mecanisme catalític. Així, la fase de retardament observada en les cinètiques en estat preestacionari tant amb el mutant E134A com amb l'enzim salvatge indiquen la presència d'un equilibri entre dues formes enzimàtiques, una d'elles inactiva, que es desplaça com a resposta a la unió de substrat. D'altra banda, el fet que en els experiments en estat preestacionari de l'enzim salvatge amb el G4G3G-2,4DNP s'obtinguin magnituds per a la fase d'acumulació superiors a la concentració d'enzim evidencia que el mecanisme catalític ha de ser ramificat. I donat que les k_{obs} obtingudes amb els diferents substrats no guarden relació amb la seva reactivitat no és possible que l'etapa causant de l'acumulació de producte sigui una etapa catalítica. La comparació dels paràmetres cinètics obtinguts a partir de les velocitats inicials prèvies a la fase d'acumulació (v_i) i dels obtinguts un cop assolit l'estat estacionari final (v_{ss}) descarten qualsevol tipus de mecanisme basat en una inhibició competitiva o acompetitiva per substrat i apunten a un canvi conformacional de l'enzim posterior a la unió de substrat i a la formació del complex enzim-substrat productiu que, per als substrats assajats, comporta una disminució de l'activitat catalítica de l'enzim. S'observa també que la segona branca té més pes (K_8 i K_7 més grans) com menys reactiu és el substrat. Finalment, el fet que les anàlisis de Hammett en k_{cat} de l'enzim salvatge mostrin un comportament bifàsic en què els substrats menys reactius mostren un augment d'activitat respecte del que seria esperable en un mecanisme amb una única espècie activa, condueix al plantejament que tant l'espècie SES^* com SES^{**} siguin actives, de manera que per als substrats menys reactius la velocitat de reacció reflecteixi bàsicament la catàlisi a través d'aquesta segona branca activa. A més, la manca de semblança entre les anàlisis de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M porta implícita que l'etapa determinant de la velocitat de reacció per a la segona branca sigui posterior a l'etapa de glicosidació. De fet, les anàlisis de Hammett no són els únics resultats en què s'ha observat una segona espècie enzimàtica activa, i així per exemple en algunes cinètiques dels mutants en la Tyr152 o en cinètiques de l'enzim salvatge amb el β -glucà d'ordi el model que millor s'ajusta als resultats obtinguts implica una segona espècie activa.

A la figura 7.1 es presenta el mecanisme proposat per a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* que tot i ser complex permet explicar tant els resultats que s'ajusten a una cinètica de Michaelis clàssica, com els d'inhibició o activació obtinguts en funció de les condicions de reacció emprades, així com en funció del substrat o mutant que s'ha utilitzat.

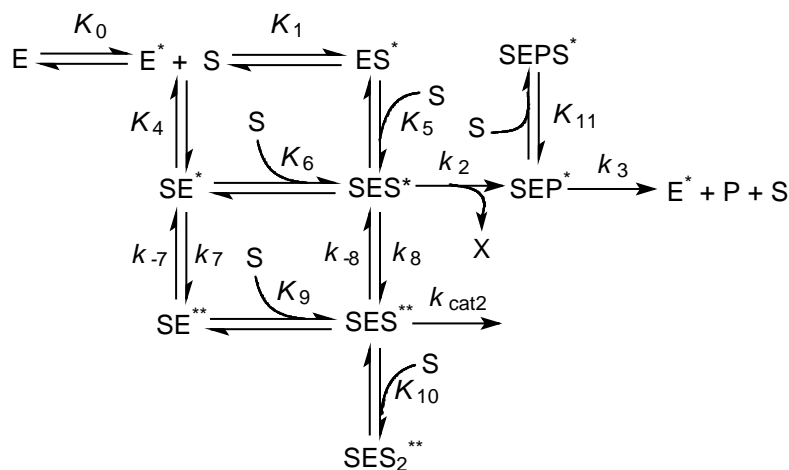


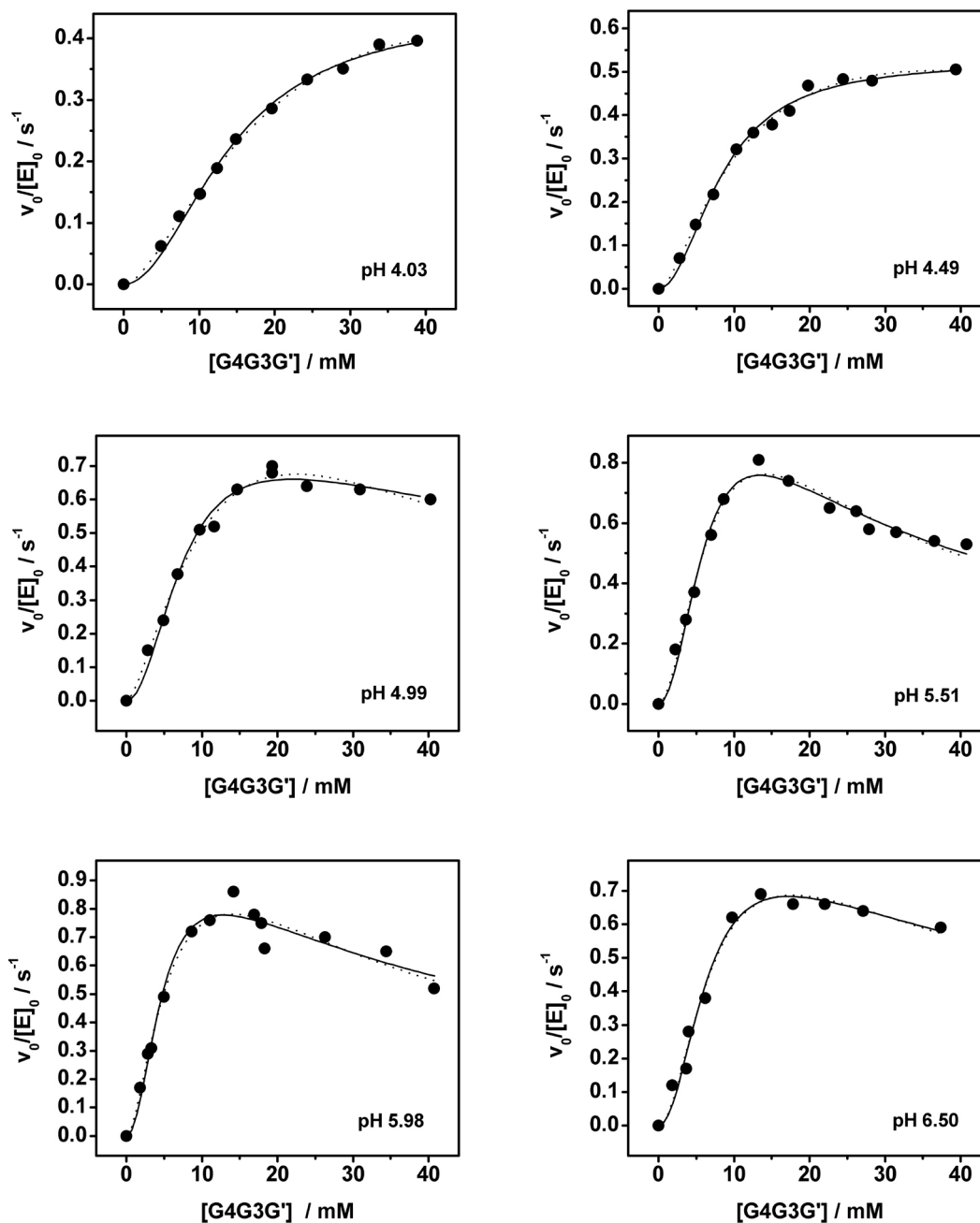
Figura 7.1. Mecanisme deduït a partir dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari i les anàlisis de Hammett de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Aquest model inclou la presència de tres formes enzimàtiques diferents, de les quals, només dues presenten una activitat catalítica significativa. En un inici, l'enzim en la seva forma lliure coexisteix en dues conformacions, de les quals només una és capaç d'unir el substrat de forma productiva. Perquè es doni aquesta unió productiva s'ha de produir primer una unió en un seti regulador de l'enzim que se satura molt fàcilment, en un mecanisme d'activació al·lostèrica, que s'ha fet especialment palès en les cinètiques d'hidratació de glicals. A continuació, la unió productiva del substrat al centre actiu de la β -glucanasa induïx un canvi conformacional que comporta un canvi d'activitat enzimàtica. Aquest canvi conformacional no afecta tota la població d'enzim, de manera que s'assoleix un estat estacionari en el que coexisteixen dues formes actives d'enzim en diferent proporció en funció de la reactivitat del substrat i de les condicions de reacció. La inhibició acompetitiva per substrat observada pot anar lligada a una d'aquestes dues conformacions per unió d'una segona molècula de substrat al centre actiu amb la conseqüent formació d'un complex abortiu.

Idoneïtat del mecanisme per tal d'explicar la hidratació de glicals

Tot i que aquest mecanisme pugui semblar un model molt allunyat del mecanisme que es proposa per a la hidratació de glicals per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, en el fons recull els dos aspectes principals del mecanisme, activació al·lostèrica i inhibició acompetitiva pel propi substrat. De fet, l'ajust d'aquest mecanisme a les dades obtingudes en la hidratació enzimàtica del glical G4G3G', que es mostra a la figura 7.2 en forma de línia puntejada, és tan bo o millor (en termes de r^2) que el del model senzill, ara bé l'enorme complexitat del mecanisme fa impossible l'obtenció d'un valor fiable dels paràmetres cinètics en base als resultats obtinguts.

El terme d'activació al·lostèrica en aquest treball s'ha fet especialment significatiu en les cinètiques d'hidratació del glicàl **56**, tot i que també s'ha observat en la hidròlisi del β -glucà i s'havia vist amb anterioritat en les cinètiques d'hidròlisi del G3G-MU, que és un substrat molt pobre de la 1,3-1,4- β -glucanasa, per part de l'enzim de *Bacillus macerans* [212]. A més és un fenomen que es fa necessari per tal d'explicar el comportament en estat preestacionari observat en el present treball. El fet que no s'observi en les cinètiques d'hidròlisi d'altres substrats en estat estacionari, no indica necessàriament que no es doni en aquests casos, sinó que la constant de dissociació d'aquesta primera etapa d'unió és molt baixa, de manera que el seti regulador es troba saturat a molt baixes concentracions de substrat.



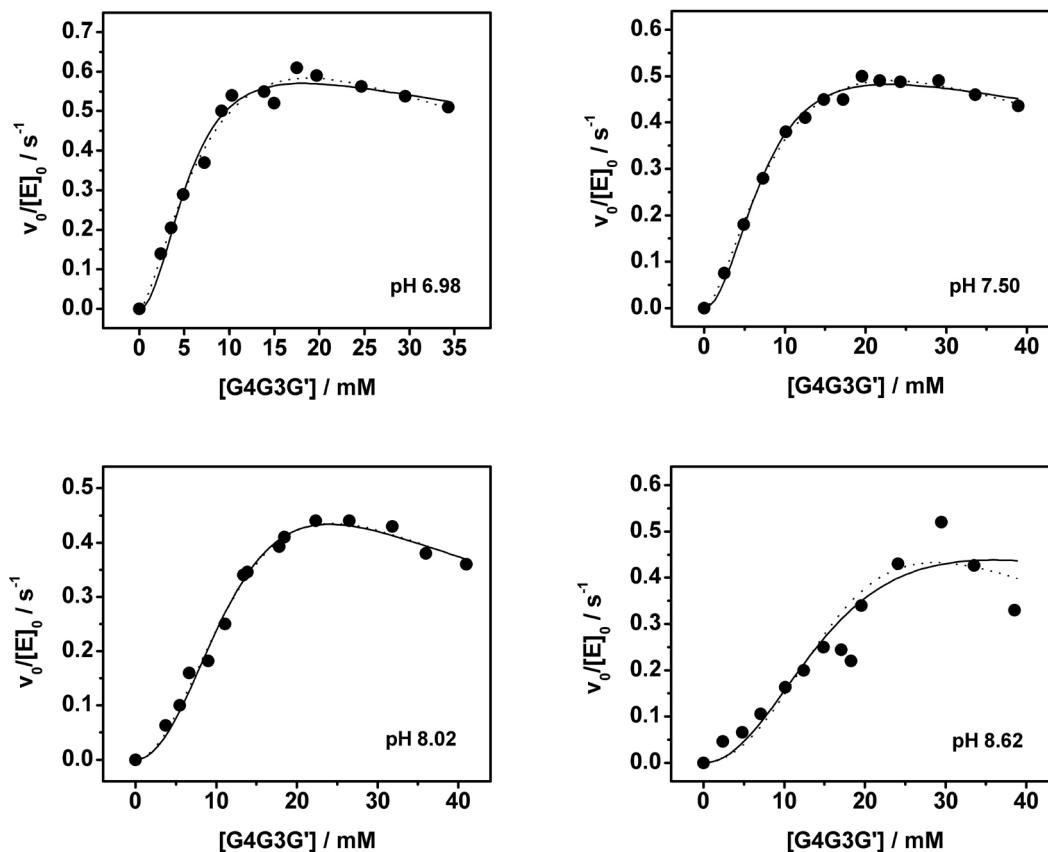


Figura 7.2. Cinètiques d'hidratació del glical G4G3G' amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. A les gràfiques es representa la $v_0/[wt]_0$ enfront de la concentració de glical. Condicions de reacció: tampó 5.5 mM fosfat, 5.5 mM citrat, 0.1 mM CaCl_2 , a 30 °C, $[wt] = 1.86 \mu\text{M}$ 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 en línia contínua, i al model de la figura 7.1 en línia puntejada.

Dues activitats enzimàtiques diferents

Entrant en el mecanisme, pot sobtar que el canvi conformacional induït per la formació del complex enzim-substrat productiu comporti una disminució de l'activitat enzimàtica, sobretot donat que els enzims han evolucionat per tal d'efectuar la catàlisi amb la màxima eficiència. En aquest sentit es fa necessari recordar diverses coses: d'una banda, que les cinètiques en estat preestacionari en què s'ha observat aquesta disminució d'activitat només s'han realitzat sobre tres substrats de l'enzim, i que potser no és una mostra representativa del comportament general (sense anar més lluny l'anàlisi de Hammett en k_{cat} de la β -glucanasa salvatge implica que per als substrats menys activats es dona un augment de l'activitat enzimàtica, i no una disminució); segonament, és possible que pel fet que els substrats assajats siguin oligosacàrids sintètics molt més petits que els substrats naturals de l'enzim i estiguin més activats per a la hidròlisi, es posi de rellevància (o pel contrari quedi emmascarada) alguna part del mecanisme enzimàtic que no és cinèticament significativa quan aquest enzim actua sobre els seus substrats naturals; finalment, cas que aquesta disminució d'activitat

també es doni en actuar sobre el seu substrat natural, és fàcil que l'efecte es vegi compensat o sigui necessari, pels beneficis que pugui comportar el canvi de conformació *in vivo*, ja sigui en forma d'una millora en la unió del substrat polisacàridic ja sigui com un mecanisme de regulació.

De fet, aquest no és l'únic cas en què s'observa una fase d'acumulació del producte en estat preestacionari per a una glicosidasa, que no va lligat a una etapa de desglicosidació més lenta que no l'etapa de glicosidació. La β -glucosidasa de la paret cel·lular dels grans de soja presenta unes cinètiques d'estat preestacionari similars a les observades en el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa, amb una fase inicial d'acumulació de producte, tot i que en aquest cas, la k_{obs} sí mostra una dependència clara de la concentració de substrat [490]. El mecanisme de la β -glucosidasa s'ha resolt amb un model d'histèresi [491, 492] amb dues conformacions enzimàtiques que estan en equilibri i on totes dues poden catalitzar la hidròlisi del substrat amb diferent eficiència [490] (figura 7.3). D'entrada, en dissolució predomina la forma més activa, però la unió del substrat desplaça l'equilibri cap a la conformació menys activa. Tanmateix, els autors no s'atreveixen a aventurar una possible explicació fisiològica d'aquest comportament.

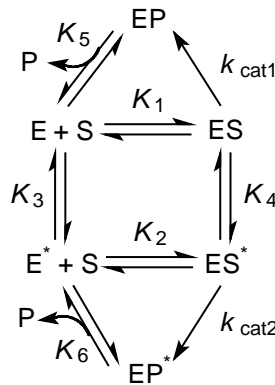


Figura 7.3. Mecanisme proposat per a la β -glucosidasa de la paret cel·lular dels grans de soja, en què coexisteixen dues conformacions enzimàtiques amb diferent activitat, i diferent afinitat pel producte de reacció [490].

Un altre cas en què s'observa una fase d'acumulació de producte, no associat al mecanisme de retenció de configuració pròpiament dit, és el de la hidròlisi d'un anàleg polisacàridic fluorat de la cel·lulosa per part de la Cel7A de *Trichoderma reesei* [493]. En aquest cas, l'explicació sembla ser la processivitat de l'enzim, ja que la hidròlisi d'oligosacàrids cromofòrics rendeix cinètiques lineals, i la fase d'acumulació de producte només s'observa en la hidròlisi de polisacàrids.

Per tal d'intentar racionalitzar el mecanisme proposat per a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* es plantegen tres interpretacions diferents que podrien explicar aquesta complexitat.

7.2. Canvi conformacional lligat a una regulació directa de l'activitat enzimàtica

Els mecanismes de regulació al·lostèrica són freqüents en enzimologia, i entre ells, l'activació per substrat o inhibició per producte moltes vegades regulen l'activitat enzimàtica en vies metabòliques.

Entre les glicosidases la comparació de l'estructura de l'enzim lliure amb la d'algun complex enzim·ligand ha permès detectar en diversos casos canvis conformacionals induïts per la unió de lligand, que són essencials per a l'activitat enzimàtica. A continuació es comenten breument alguns dels mateixos. La unió de cel·lohexaosa amb l'endoglucanasa CelC de *Clostridium thermocellum* [52], la de l'inhibidor acarbossa a l'isoenzim II de l' α -amilasa pancreàtica de porc [369, 483], i les de diferents cel·luloligosacàrids a l'endo/exocel·lulasa E4 de *Thermomonospora fusca* [53] o a la cel·lobiohidrolasa Cel6A d'*Humicola insolens* [77, 494] comporten, entre altres, una reorientació del llaç on està situat el residu que fa el paper d'àcid general, molt possiblement situant-lo adequadament per tal d'exercir el seu paper en catàlisi. A l'endo-1,4- β -xilanasasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* [60] també es dona un moviment en resposta a la unió de substrat que ajuda al correcte posicionament del residu que actua com a àcid general. A la β -amilasa de gra de soja, en unir substrat s'observa el tancament d'un llaç que cobreix el centre actiu, que té forma de butxaca, de manera que per a l'alliberament del producte de reacció es fa necessària l'obertura del mateix [495]. A les cel·lulases Cel6A de *Trichoderma reesei* [54, 76, 496], i a les cel·lobiohidrolases d'*Humicola insolens* [55, 77, 497], que tenen un centre actiu en forma de túnel, s'ha comprovat que les llaçades que el cobreixen poden obrir-se donant accés al centre actiu a la cadena de cel·lulosa i un cop ja ha tingut lloc aquest primer atac *endo*-, les llaçades es tanquen, convertint l'enzim en una exocel·lulasa processiva. Aquest moviment de llaços en les cel·lobiohidrolases que tenen centres actius en forma de túnel explica que aquests enzims no només alliberin unitats de cel·lobiosa per l'extrem del polímer, com és d'esperar en una cel·lobiohidrolasa processiva, sinó que també catalitzin atacs *endo*- [498-501], i a més, permet l'accés del substrat polimèric al centre actiu en forma de túnel. També s'han observat moviments de llaços externs induïts per la unió del substrat a les endoglucanases Cel45A d'*Humicola insolens* [56], la Cel9G de *Clostridium cellulolyticum* [50], la Cel6A de *Thermobifida fusca* [78], l' α -amilasa pancreàtica humana [49]. En altres casos en què no s'ha observat experimentalment, s'ha proposat que la unió del substrat ve assistida per l'obertura d'algun llaç per analogia als exemples anteriors, com és el cas d'una quitinasa de *Serratia marcescens* [502], de la cel·lulasa Cel48F de *Clostridium cellulolyticum* [503] i la *k*-carragenasa de *P. carrageenovora* [143]. Aquests canvis conformacionals lligats a la unió de substrat no només es donen en els llaços externs, i per exemple en el cas de l'endoglucanasa E2 de *Thermomonospora fusca*, que no disposa de llaços que cobreixen el centre actiu, també es dona un canvi conformacional en unir el substrat [504, 505]. Una altra possibilitat l'exemplifiquen la *t*-carragenasa [58] i la 1,3-1,4- β -glucanasa d'ordi [57, 506], en què com a resposta a la unió al substrat es mou tot un mòdul de proteïna respecte d'un altre de manera que el centre actiu, que en l'enzim lliure té una estructura oberta, es tanca en unir el substrat cap a una conformació en forma de túnel en el primer cas, i de butxaca, en el segon.

En el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* es pot plantejar una primera possibilitat, en la que el canvi conformacional induït per la formació del complex de Michaelis, fes accessible la unió d'una segona molècula de substrat al centre actiu de manera que resulti en la formació d'un complex abortiu. El canvi conformacional pot donar-se en diferents parts de la proteïna, però donat que els llaços solen ser les regions més flexibles, i donat el gran nombre d'exemples en què l'accessibilitat de glicòsids al centre actiu ve marcada pel moviment d'un llaç flexible, es proposa que el canvi conformacional pugui ser degut al moviment del llaç que cobreix parcialment el centre actiu.

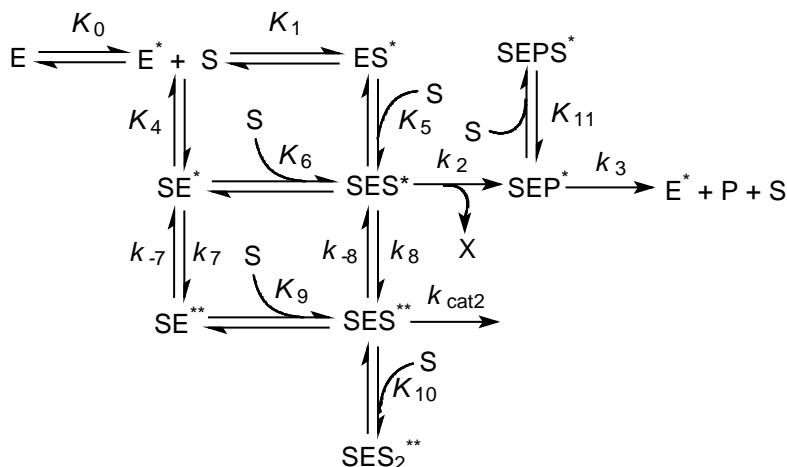


Figura 7.4. Mecanisme de regulació proposat per a la hidròlisi de substrats per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. La unió a un centre al·lostèric comporta l'inici de la reacció d'hidròlisi, mentre que un excés de substrat comporta una disminució de l'activitat per formació d'un complex abortiu després d'un canvi conformacional del complex de Michaelis.

Segons aquesta primera hipòtesi (figura 7.4), el mecanisme proposat no és més que una forma complexa de regular l'activitat enzimàtica. Així, en un entorn on hi hagi substrat disponible, aquest s'uneix amb gran afinitat al seti regulador, iniciant d'aquesta manera l'activitat enzimàtica aportada pels dos complexos productius SES^* i SES^{**} , on aquest darrer presenta una estructura de centre actiu més oberta. Ara bé, quan la concentració de substrat és molt elevada, és possible que dues molècules de substrat s'encabeixin alhora al centre actiu de la forma SES^{**} aprofitant la major obertura del llaç, que portaria a un tancament incorrecte del centre actiu amb la conseqüent pèrdua d'activitat. D'aquesta manera s'aconseguiria la regulació de l'activitat enzimàtica per tal de mantenir una quantitat de producte constant dins d'uns marges.

7.3. Canvi conformacional lligat a la degradació processiva de substrats polimèrics

La processivitat està altament lligada a la hidròlisi de substrats polimèrics. Generalment està acceptat que els enzims que degraden polímers de carbohidrats ho poden realitzar fent servir principalment tres mecanismes diferents [507, 508]: a) un mecanisme de cadena múltiple en què el complex enzim-substrat es dissocia després de cada cicle catalític, b) un mecanisme de cadena senzill, en què l'enzim continua associat al substrat fins que no hi ha més enllaços per hidrolitzar, c) un mecanisme d'atac múltiple,

en què es donen un nombre mig d'atacs després de la formació del complex enzim-substrat. Els dos darrers mecanismes s'anomenen processius [7, 509].

Les glicosidases han adoptat diferents mecanismes per a la hidròlisi processiva del substrat, alguns tenen centres actius tancats en forma de túnel o anell, sovint amb l'ajuda de llaços mòbils, que permeten fixar millor el substrat; d'altres tenen mòduls d'unió de carbohidrats o punts d'ancoratge addicionals a més del centre actiu; i en d'altres és l'arquitectura mateixa del centre actiu, que amb residus posicionats estratègicament, facilita el lliscament del substrat entre dos esdeveniments hidrolítics (per a més informació veure l'apèndix de processivitat, apèndix 4). La 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* té un centre actiu estès en forma d'esclatxa, parcialment cobert per un llaç, i no està unida a cap mòdul d'unió de carbohidrat. Els seus substrats naturals són polisacàrids amb una estructura d'enllaços mixtes β -1,3 i β -1,4. Malgrat que no hi ha resultats clars que apuntin que aquest enzim actua amb processivitat, tampoc n'hi ha que indiquin que la seva activitat sigui exclusivament *exo*- (Sandra Rodríguez, comunicació personal). Aquests resultats serien compatibles amb una actuació similar a la de les cel·lulases, amb un atac inicial *endo*-, seguit d'una degradació processiva *exo*-, o bé amb la utilització del tercer mecanisme per a la degradació de polisacàrids, amb un nombre mig d'atacs sobre la mateixa cadena polisacàridica. Amb aquestes premisses es pot plantejar que per a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* el canvi conformacional sigui un pas previ per tal d'assolir una estructura apta per a la hidròlisi processiva del seu substrat natural. En aquest cas seria la unió productiva al centre actiu, la que estimularia la processivitat, com s'observa en el cas de la quitinasa A [510, 511] i la Cel9A [512].

En el cas dels substrats sintètics assajats la disminució de l'activitat associada al canvi conformacional és, en alguns casos, considerable, plantejant el dubte de fins a quin punt el fet de mantenir unit el substrat al centre actiu per a la seva degradació processiva pot compensar aquesta disminució d'activitat. Ara bé, aquest no seria un cas únic, ja que s'han descrit diversos casos de glicosidases processives en què per tal d'adaptar-se a un mecanisme processiu, la velocitat d'hidròlisi se'n veu ressentida [512-514]. A més, també és possible que en fer servir el seu substrat natural la disminució d'activitat no sigui tan acusada i que l'eficiència del sistema en assegurar una major concentració local de substrat, sigui superior. Sembla, però, que si es tractés de processivitat, el mecanisme no seria el clàssic, ja que un mecanisme de processivitat no deixa de ser un mecanisme lineal en què les etapes de lliscament de substrat i d'hidròlisi es van intercalant [515] (figura 7.5).

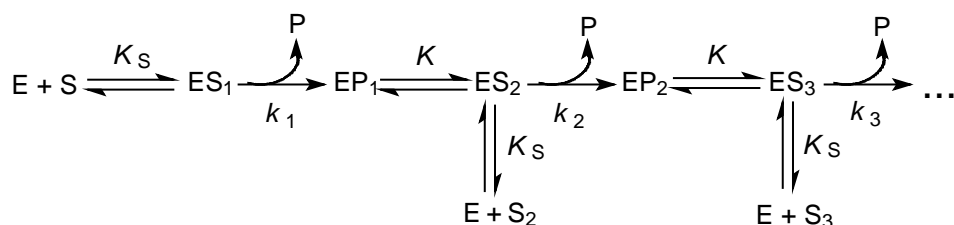


Figura 7.5. Esquema d'un mecanisme clàssic d'hidròlisi processiva d'un substrat polimèric. Els complexos ES_1 , ES_2 , ES_3 són diferents complexos productius enzim-substrat en què va disminuint el grau de polimerització del substrat degut a les etapes hidrolítics, i els complexos EP_1 , EP_2 , EP_3 corresponen als complexos un cop s'ha alliberat l'aglicona després de cada etapa hidrolítica. La K és la constant d'equilibri de l'etapa de lliscament del substrat.

En el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa, amb un mecanisme no lineal, la processivitat implicaria que les dues formes enzimàtiques, per exemple, amb el llaç més obert i més tancat, haurien de ser actives. Per analogia al que s'ha vist amb altres glicosidases, en què el tancament del llaç propicia la processivitat, la conformació més oberta seria la més activa, i la tancada, que afavoriria la processivitat en el substrat polimèric, tindria una velocitat d'hidròlisi inferior (figura 7.6). Igualment, es pot plantejar la hipòtesi que la conformació més oberta permet la unió d'una altra molècula de substrat, que seria la causant de la inhibició acompetitiva per substrat, observada amb els substrats sintètics assajats, mentre que a la conformació més tancada no seria possible l'accés d'aquesta segona molècula de substrat.

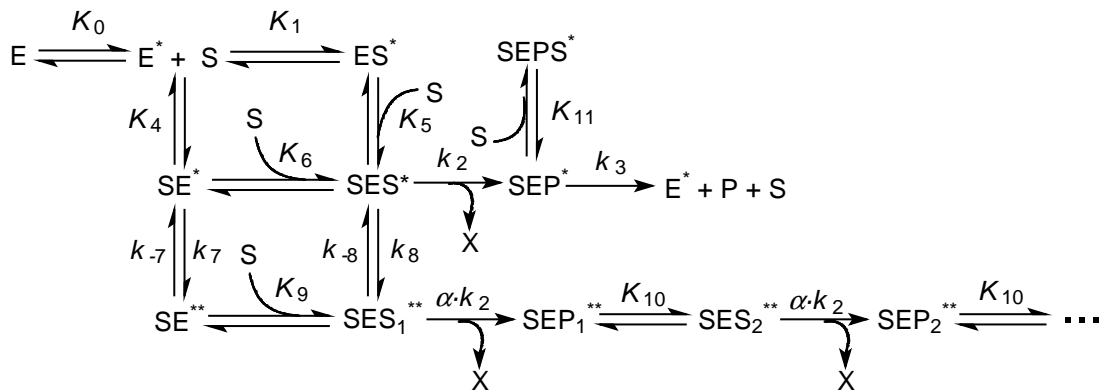


Figura 7.6. Mecanisme proposat per a la hidròlisi de substrats polimèrics per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, que inclou la unió a un seti regulador de l'activitat enzimàtica necessària per a la formació del complex productiu, i on el canvi conformacional propiciaria la degradació processiva del substrat. Aquest model inclou en la primera branca l'etapa d'inhibició acompetitiva observada amb alguns substrats sintètics.

7.4. Coexistència de l'activitat hidrolítica i transglicosidasa de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en dues conformacions enzimàtiques diferents

Una altra opció és que les dues activitats conegudes de la 1,3-1,4- β -glucanasa, la d'hidròlisi del substrat i l'activitat transglicosidasa coexisteixin en dues conformacions diferents de l'enzim. En el cas de l'endo-1,4- β -xilanasas II de *Trichoderma reesei* s'han observat dues estructures cristal·logràfiques diferents de l'enzim, que s'han fet evidents a dos pH diferents. Aquest enzim, que s'assembla estructuralment a la 1,3-1,4- β -glucanasa amb un centre actiu en forma d'esclatxa, hidrolitza el xilà amb retenció de configuració, i també presenta activitat transglicosidasa. Sembla que en aquest enzim el canvi conformacional entre les dues conformacions observades altera les posicions relatives dels dos residus catalítics i les xarxes de ponts d'hidrogen al seu voltant. Es proposa que les dues conformacions coexisteixen i poden jugar un paper important en la modulació dels pK_a dels residus catalítics, i que possiblement una de les conformacions està implicada en l'activitat transglicosidasa mentre que l'altra ho està en l'activitat hidrolasa [516]. El mateix podria tenir lloc en la 1,3-1,4- β -glucanasa, amb la diferència

que en aquest darrer cas l'aparició de les dues conformacions actives es dona en resposta a la formació del complex de Michaelis. Tot i que la reacció d'hidròlisi del substrat i la de transglicosidació tenen un intermedi en comú, es descarta que el canvi conformacional es doni en l'intermedi (de manera que segons sigui la conformació d'aquest, es vegi afavorida l'entrada l'aigua i es doni l'etapa de desglicosidació, o l'entrada d'una altra molècula de substrat i tingui lloc la transglicosidació) (figura 7.7), ja que aquest mecanisme no és capaç d'explicar els resultats obtinguts en estat preestacionari.

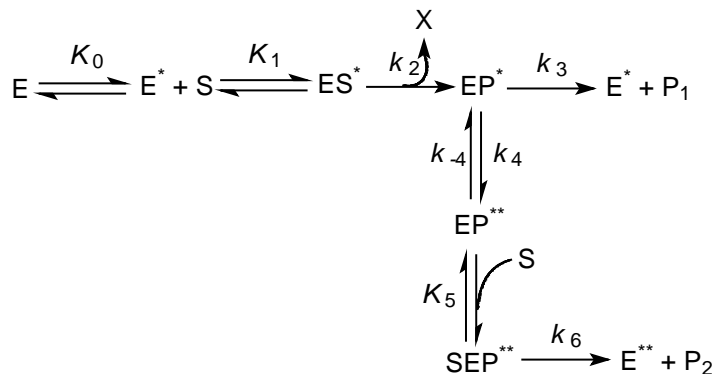


Figura 7.7. Mecanisme que inclou un canvi conformacional de l'intermedi de reacció que possibilitaria la unió de la segona molècula de substrat al centre actiu, necessària en la reacció de transglicosidació. La constant de velocitat k_3 correspon a l'etapa de desglicosidació de l'activitat hidrolítica, mentre que la k_6 és la constant de velocitat de l'etapa de transglicosidació.

En base al mecanisme que millor s'ajusta als resultats obtinguts, es proposa el mecanisme de la figura 7.8. S'ha comprovat que el canvi conformacional no comporta un canvi significatiu del pK_a del residu que actua com a àcid general, però es desconeix el seu efecte sobre el pK_a del nucleòfil, i sobre les diferents interaccions enzim-substrat. De manera que es pot plantejar que el canvi conformacional afavoriria la unió d'una segona molècula de substrat al centre actiu per tal de dur a terme la reacció de transglicosidació, que generalment, en l'enzim salvatge, té una velocitat molt inferior a la d'hidròlisi. En aquest model la unió d'una segona molècula de substrat al centre actiu de la conformació que catalitza la transglicosidació comporta la formació d'un nou producte de reacció, mentre que una unió similar en la conformació que catalitza la hidròlisi porta a la formació d'un complex abortiu.

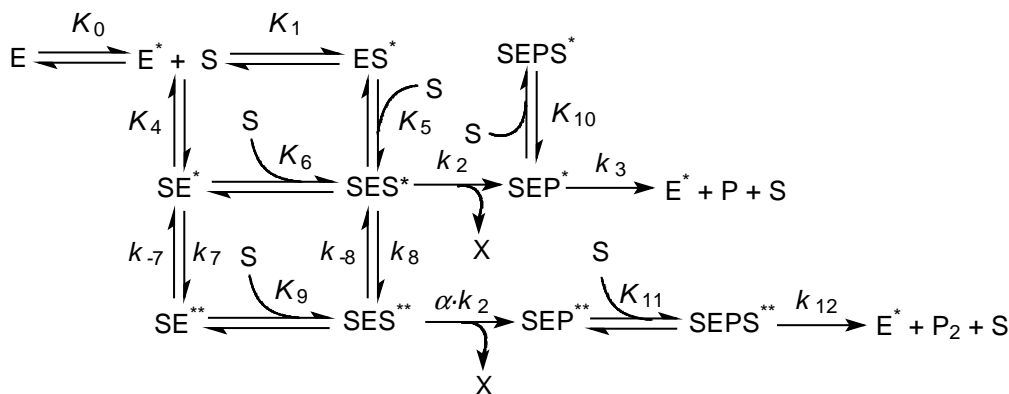


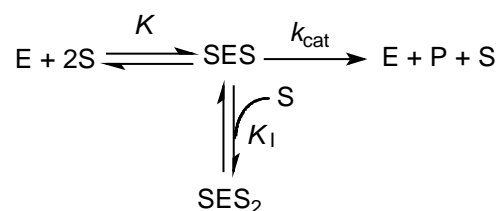
Figura 7.8. Mecanisme proposat per a la catàlisi efectuada per la 1,3-1,4- β -glucanasa, que mostra les dues possibles reaccions catalitzades per l'enzim (hidròlisi i transglicosidació) associades a les dues conformacions adoptades pel complex de Michaelis.

Aquest mecanisme podria representar una altra forma de regular la concentració de substrats oligosacàridics presents en el medi. Així, en funció de la concentració relativa de substrats i productes d'hidròlisi es podria decantar l'equilibri cap a una activitat o una altra, ja que els productes d'hidròlisi són alhora substrats de l'enzim per a l'activitat transglicosidasa.

S'han presentat tres possibles interpretacions del mecanisme ramificat proposat per a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* que no tenen perquè ser mútuament excloents. Així doncs, és possible que en funció del grau de polimerització del substrat, de la seva reactivitat (en base a la reactivitat del grup sortint), i/o de les condicions de reacció una de les activitats proposades guanyi pes enfront de les altres.

Conclusions

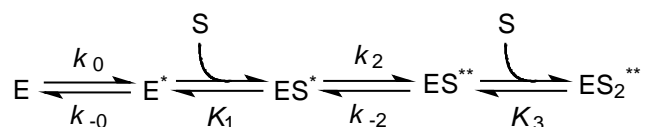
1.- La 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* catalitza la hidratació enzimàtica del glical **56** seguint un mecanisme que inclou una etapa d'activació al·lostèrica i, a pH > 4.5, inhibició acompetitiva per substrat; aspectes aquests, que queden recollits en el mecanisme catalític que es proposa per a la hidròlisi de substrats; tot i així, donada la complexitat del mateix, s'ajusta el següent mecanisme per tal d'obtenir uns paràmetres cinètics representatius de la reacció d'hidratació:



2.- El perfil de pH en k_{cat} de l'activitat d'hidratació del glical **56** permet descartar que el Glu134 jugui en aquesta reacció el doble paper de residu àcid general i nucleòfil. Per contra, es proposa que en una primera etapa el glical és hidratat pel residu Asp136 mentre que el Glu134 actua com a nucleòfil, i en una segona etapa el Glu138 actua com a base general, augmentant la nucleofília d'una molècula d'aigua que ataca l'intermedi glicosil-enzim.

3.- Donat que la hidròlisi del 2-desoxiglicòsid **68** és més ràpida que la del seu anàleg completament hidroxilat **24** s'arriba a la conclusió que, si la reacció d'hidròlisi del compost **68** segueix el mateix mecanisme que la dels substrats completament hidroxilats, la interacció per pont d'hidrogen entre l'hidroxil a C2 del substrat i el nucleòfil no és una interacció important en la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. També s'arriba a aquesta conclusió a partir de la velocitat d'hidratació del glical **56**, que és comparable a la velocitat d'hidròlisi de trisacàrids cromofòrics com el substrat **18**.

4.- Els resultats dels estudis d'unió enzim-lligand en estat preestacionari permeten proposar un mecanisme per tal d'explicar la unió del G4G3G-MU (**18**) al mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa, que comporta l'alternança de dues etapes de canvi conformacional amb dues etapes d'unió de substrat :

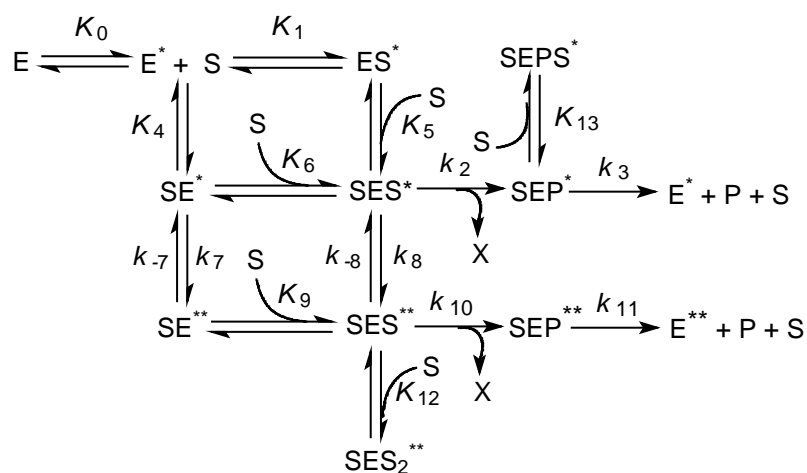


Aquest mecanisme implica el desplaçament d'un equilibri prèviament existent entre les poblacions de dues conformacions enzimàtiques, com a resposta a la unió del substrat al centre actiu per tal de formar el complex productiu; aquest, al seu torn està sotmès a un canvi conformacional que comporta la unió d'una segona molècula de substrat. Perquè

aquesta primera etapa d'equilibri entre les dues conformacions enzimàtiques es faci evident a les cinètiques la conformació E ha de ser molt més estable que la conformació E*, però ha de ser incapaç d'unir substrat, de forma que el que es mesura a l'etapa de retardament sigui l'establiment d'un nou equilibri poblacional induït per la presència del substrat.

5.- Els resultats obtinguts en els estudis d'hidròlisi de glicòsids en estat preestacionari permeten descartar el mecanisme lineal d'hidròlisi amb retenció de configuració per a la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

6.- A partir dels resultats en estat preestacionari i de les anàlisis de Hammett de la 1,3-1,4-β-glucanasa es proposa el següent mecanisme per tal d'explicar l'activitat catalítica de l'enzim:



Segons aquest mecanisme, la 1,3-1,4-β-glucanasa tindria un seti regulador de l'activitat enzimàtica que se satura a baixa concentració de substrat, amb una unió no-productiva forta (formació del complex SE*). Aquesta unió, que és necessària perquè es formi el complex productiu, SES*, es dona junt amb la unió del substrat al centre actiu en la fase de retardament. Perquè la fase de retardament vingui determinada pel canvi conformacional previ de l'enzim, les dues etapes d'uníó han de ser ràpides. A continuació les dues espècies SE* i SES* experimenten un canvi conformacional lent governat per la k_obs de la fase d'acumulació, en què es transformen en les espècies SE** (no productiva) i SES** (amb una activitat enzimàtica diferent a la del complex SES*), respectivament. Per als substrats que, a més, presenten inhibició acompetitiva per substrat hi ha una darrera etapa de formació del complex quaternari. Aquesta inhibició es pot donar tant sobre el complex ternari SES** (formant el complex SES2**) com sobre l'intermedi de reacció SEP* (formant el complex SEPS*).

A partir dels pendents de l'anàlisi de Hammett en k_cat/K_M es proposa que el grau de desenvolupament de càrrega en l'estat de transició per a l'etapa de glicosidació de la primera branca és molt important, amb una protonació pràcticament nul·la (pendent de -1), mentre que per a l'etapa de glicosidació de la segona branca és bastant més moderat (pendent de -0.44). L'anàlisi de Hammett en k_cat de l'enzim salvatge indica que mentre que per a la primera branca l'etapa determinant de la velocitat de reacció és l'etapa de glicosidació, per a la segona branca, que pren rellevància a nivell cinètic per als substrats de pK_a ≥ 7.5, ho és la de desglicosidació.

Bibliografia

- 1 Laine, R. A. (1994) *Glycobiology* **4**, 759-767
- 2 Wolfenden, R., Lu, X., Young, G. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6814-6815
- 3 Wolfenden, R., Snider, M. J. (2001) *Acc. Chem. Res.* **34**, 938-945
- 4 Koshland, D. E. (1953) *Biol. Rev.* **28**, 416-436
- 5 Rye, C. S., Withers, S. G. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 573-580
- 6 Davies, G. J., Gloster, T. M., Henrissat, B. (2005) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 637-645
- 7 Davies, G. J., Henrissat, B. (1995) *Structure* **3**, 853-859
- 8 Sinnott, M. L. (1990) *Chem. Rev.* **90**, 1171-1202
- 9 Tomme, P., Kwan, E., Gilkes, N. R., Kilburn, D. G., Warren, R. A. J. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 4216-4223
- 10 Hahn, M., Pons, J., Planas, A., Querol, E., Heinemann, U. (1995) *FEBS Lett.* **374**, 221-224
- 11 Varrot, A., Leydier, S., Pell, G., Macdonald, J. M., Stick, R. V., Henrissat, B., Gilbert, H. J., Davies, G. J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 20181-20184
- 12 IUBMB. (1992) *Enzyme Nomenclature. Recommendations*, Academic Press, San Diego
- 13 Henrissat, B. (1991) *Biochem. J.* **280**, 309-316
- 14 Henrissat, B., Davies, G. J. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 637-644
- 15 Davies, G. J., Wilson, K. S., Henrissat, B. (1997) *Biochem. J.* **321**, 557-559
- 16 Planas, A., Malet, C. (1995) in *Carbohydrate Bioengineering* (Petersen, S. B., Svensson, B. and Pedersen, S., eds.), pp. 85-95, Elsevier, Amsterdam
- 17 Vyas, N. K. (1991) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 732-740
- 18 Rand-Meir, T., Dahlquist, F. W., Raftery, M. A. (1969) *Biochemistry* **8**, 4206-4214
- 19 Sinnott, M. L., Souchard, I. J. L. (1973) *Biochem. J.* **133**, 89-98
- 20 Hammett, L. P. (1935) *Chem. Rev.* **17**, 125-136
- 21 Shiner, V. J., Rapp, M. W., Wolfsberg, M., Halevi, E. A. (1968) *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 7171-7172
- 22 Shiner, V. J., Rapp, M. W., Pinnick, H. R. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 232-233
- 23 Dahlquist, F. W., Rand-Meir, T., Raftery, M. A. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**, 1194-1198
- 24 Dahlquist, F. W., Rand-Meir, T., Raftery, M. A. (1969) *Biochemistry* **8**, 4214-4221
- 25 Kirsch, J. F. (1977) *Isotope Effects on Enzyme-Catalysed Reactions*, University Park Press, Baltimore
- 26 Hosie, L., Sinnott, M. L. (1985) *Biochem. J.* **226**, 437-446
- 27 Lemieux, R. U., Huber, G. (1955) *Can. J. Chem.* **33**, 128-133
- 28 Capon, B. (1969) *Chem. Rev.* **69**, 407-498
- 29 Bennet, A. J., Sinnott, M. L. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7287-7294
- 30 Namchuk, M. N., Withers, S. G. (1995) *Biochemistry* **34**, 16194-16202
- 31 McCarter, J. D., Adam, M. J., Withers, S. G. (1992) *Biochem. J.* **286**, 721-727
- 32 Davies, G. J., Duros, W. M. A., Varrot, A., Zechel, D. L. (2003) *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 523-527
- 33 Deslongchamps, P. (1983) *Stereoelectronic effects in organic chemistry*, Pergamon Press, Londres
- 34 Kirby, A. J. (1984) *Acc. Chem. Res.* **17**, 305-311
- 35 Notenboom, V., Williams, S. J., Hoos, R., Withers, S. G., Rose, D. R. (2000) *Biochemistry* **39**, 11553-11563

- 36 van Doorslaer, E., van Opstal, O., Kersters-Hilerson, H., De Bruyne, C. K. (1984) *Bioorg. Chem.* **12**, 158-169
- 37 Kempton, J. B., Withers, S. G. (1992) *Biochemistry* **31**, 9961-9969
- 38 Tull, D., Withers, S. G. (1994) *Biochemistry* **33**, 6363-6370
- 39 Vocadlo, D. J., Davies, G. J., Laine, R., Withers, S. G. (2001) *Nature* **412**, 835-839
- 40 Miao, S., Ziser, L., Aebersold, R., Withers, S. G. (1994) *Biochemistry* **33**, 7027-7032
- 41 Withers, S. G., Aebersold, R. (1995) *Protein Sci.* **4**, 361-372
- 42 McCarter, J. D., Withers, S. G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6889-6894
- 43 McCarter, J. D., Yeung, W., Chow, J., Dolphin, D., Withers, S. G. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5792-5797
- 44 MacKenzie, L. F., Sulzenbacher, G., Divne, C., Jones, T. A., Woldike, H. F., Schulein, M., Withers, S. G., Davies, G. J. (1998) *Biochem. J.* **335**, 409-416
- 45 Withers, S. G., Rupitz, K., Street, I. P. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 7929-7932
- 46 Sinnott, M. L., Withers, S. G. (1974) *Biochem. J.* **143**, 751-762
- 47 Boehr, D. D., Dyson, H. J., Wright, P. E. (2006) *Chem. Rev.* **106**, 3055-3079
- 48 Morton, A., Matthews, B. W. (1995) *Biochemistry* **34**, 8576-8588
- 49 Nahoum, V., Roux, G., Anton, V., Rouge, P., Puigserver, A., Bischoff, H., Henrissat, B., Payan, F. (2000) *Biochem. J.* **346**, 201-208
- 50 Mandelman, D., Belaich, A., Belaich, J. P., Aghajari, N., Driguez, H., Haser, R. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 4127-4135
- 51 Juers, D. H., Heightman, T. D., Vasella, A., McCarter, J. D., MacKenzie, L., Withers, S. G., Matthews, B. W. (2001) *Biochemistry* **40**, 14781-14791
- 52 Dominguez, R., Souchon, H., Lascombe, M.-B., Alzari, P. M. (1996) *J. Mol. Biol.* **257**, 1042-1051
- 53 Sakon, J., Irwin, D., Wilson, D. B., Karplus, P. A. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 810-818
- 54 Zou, J. K., G. J., Stahlberg, J., Driguez, H., Nerickx, W., Claeysens, M., Koivula, A., Teeri, T. T., Jones, T. A. (1999) *Structure* **7**, 1035-1045
- 55 Boisset, C., Fraschini, C., Schulein, M., Henrissat, B. and Chanzy, H. (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1444-1452
- 56 Davies, G. J., Tolley, S. P., Henrissat, B., Hjort, C., Schulein, M. (1995) *Biochemistry* **34**, 16210-16220
- 57 Hrmova, M., Streltsov, V. A., Smith, B. J., Vasella, A., Varghese, J. N., Fincher, G. B. (2005) *Biochemistry* **44**, 16529-16539
- 58 Michel, G., Helbert, W., Kahn, R., Dideberg, O., Kloareg, B. (2003) *J. Mol. Biol.* **334**, 421-433
- 59 Bruice, T. C., Benkovic, S. J. (2000) *Biochemistry* **39**, 6267-6274
- 60 De Vos, D., Collins, T., Nerinckx, W., Savvides, S. N., Claeysens, M., Gerday, C., Feller, G. Van Beeumen, J. (2006) *Biochemistry* **45**, 4797-4807
- 61 Sogaard, M., Kadziola, A., Haser, R., Svensson, B. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22480-22484
- 62 Jencks, W. P. (1975) *Adv. Enzymol.* **43**, 219-410
- 63 Lighstone, F. C., Bruice, T. C. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2595-2605
- 64 Cannon, W. R., Singleton, S. F., Benkovic, S. J. (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**, 821-833
- 65 Sulzenbacher, G., Driguez, H., Henrissat, B., Schulein, M., Davies, G. J. (1996) *Biochemistry* **35**, 15280-15287

- 66 Davies, G. J., Mackenzie, L., Varrot, A., Dauter, M., Brzozowski, A. M., Schuelein, M., Withers, S. G. (1998) *Biochemistry* **37**, 11707-11713
- 67 Tews, I., Perrakis, A., Oppenheim, A., Dauter, Z., Wilson, K. S., Vorgias, C. E. (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**, 638-648
- 68 van Aalten, D. M. F., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M. G., Eijsink, V. G. H. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8979-8984
- 69 Sandgren, M., Berglund, G. I., Shaw, A., Stahlberg, J., Kenne, L., Desmet, T., Mitchinson, C. (2004) *J. Mol. Biol.* **342**, 1505-1517
- 70 Money, V. A., Smith, N. L., Scaffidi, A., Stick, R. V., Gilbert, H. J., Davies, G. J. (2006) *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 5136-5140
- 71 Verdoucq, L., Morinière, J., Bevan, D. R., Esen, A., Vasella, A., Henrissat, B. and Czjzek, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 31796-31803
- 72 Varrot, A., Schülein, M., Davies, G. J. (2000) *J. Mol. Biol.* **297**, 819-828
- 73 Prag, G., Papanikolau, Y., Tavlas, G., Vorgias, C. E., Petratos, K., Oppenheim, A. B. (2000) *J. Mol. Biol.* **300**, 611-617
- 74 Ducros, V. M. A., Zechel, D. L., Murshudov, G. N., Gilbert, H. J., Szabo, L., Stoll, D., Withers, S. G., Davies, G. J. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 2824-2827
- 75 Karaveg, K., Siriwardena, A., Tempel, W., Liu, Z.-J., Glushka, J., Wang, B.-C., Moremen, K. W. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 16197-16207
- 76 Koivula, A., Ruohonen, L., Wohlfahrt, G., Reinikainen, T., Teeri, T. T., Piens, K., Claeysens, M., Weber, M., Vasella, A., Becker, D., Sinnott, M. L., Zou, J.-Y., Kleywegt, G. J., Szardenings, M., Stahlberg, J., Jones, T. A. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10015-10024
- 77 Varrot, A., Frandsen, T. P., Driguez, H., Davies, G. J. (2002) *Acta Cryst.* **D58**, 2201-2204
- 78 Larsson, A. M., Bergfors, T., Dultz, E., Irwin, D. C., Roos, A., Driguez, H., Wilson, D. B. and Jones, T. A. (2005) *Biochemistry* **44**, 12915-12922
- 79 Vandermarliere, E., Bourgois, T. M., Rombouts, S., Van Campenhout, S., Volckaert, G., Strelkov, S. V., Delcour, J. A., Rabijns, A., Courtin, C. M. (2008) *Biochem. J.* **410**, 71-79
- 80 Guerin, D. M. A., Lascombe, M., Costabel, M., Souchon, H., Lamzin, V., Beguin, P., Alzari, P. M. (2002) *J. Mol. Biol.* **316**, 1061-1069
- 81 Papanikolau, Y., Prag, G., Tavlas, G., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B., Petratos, K. (2001) *Biochemistry* **40**, 11338-11343
- 82 Nagae, M., Tsuchiya, A., Katayama, T., Yamamoto, K., Wakatsuki, S., Kato, R. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 18497-18509
- 83 Lobsanov, Y. D., Yoshida, T., Desmet, T., Nerinckx, W., Yip, P., Claeysens, M., Herscovics, A., Howell, P. L. (2008) *Acta Cryst.* **D64**, 227-236
- 84 Newstead, S. L., Potter, J. A., Wilson, J. C., Xu, G., Chien, C-H., Watts, A. G., Withers S. G., Taylor, G. L. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 9080-9088
- 85 Isorna, P., Polaina, J., Latorre-Garcia, L., Cañada, F. J., Gonzalez, B., Sanz-Aparicio, J. (2007) *J. Mol. Biol.* **371**, 1204-1218
- 86 Caines, M. E. C., Vaughan, M. D., Tarling, C. A., Hancock, S. M., Warren, R. A. J., Withers S. G., Strynadka, N. C. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 14300-14308
- 87 Ravaud, S., Robert, X., Watzlawick, H., Haser, R., Mattes, R., Aghajari, N. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 28126-28136
- 88 van Straaten, K. E., Barends, T. R. M., Dijkstra, B. W., Thunnissen, A. W. H. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 21197-21205

- 89 Varrot, A., Frandsen, T. P., von Ossowski, I., Boyer, V., Cottaz, S., Driguez, H., Schülein, M., Davies, G. J. (2003) *Structure* **11**, 855-864
- 90 Miyake, H., Kurisu, G., Kusunoki, M., Nishimura, S., Kitamura, S., Nitta, Y. (2003) *Biochemistry* **42**, 5574-5581
- 91 Hrmova, M., De Gori, R., Smith, B. J., Fairweather, J. K., Driguez, H., Varghese, J. N., Fincher, G. B. (2002) *Plant Cell* **14**, 1033-1052
- 92 Hrmova, M., Varghese, J. N., De Gori, R., Smith, B. J., Driguez, H., Fincher, G. B. (2001) *Structure* **9**, 1005-1016
- 93 Varrot, A., Schülein, M., Fruchard, S., Driguez, H., Davies, G. J. (2001) *Acta Cryst.* **D57**, 1739-1742
- 94 Lo Leggio, L., Jenkins, J., Harris, G. W., Pickersgill, R. W. (2000) *Proteins* **41**, 362-373
- 95 Mirza, O., Skov, L. K., Remaud-Simeon, M., de Montalk, G. P., Albenne, C., Monsan, P., Gajhede, M. (2001) *Biochemistry* **40**, 9032-9039
- 96 Hasegawa, K., Kubota, M., Matsuura, Y. (1999) *Protein Eng.* **12**, 819-824
- 97 Notenboom, V., Birsan, C., Nitz, M., Rose, D. R., Warren, R. A. J., Withers, S. G. (1998) *Nat. Struct. Biol.* **5**, 812-818
- 98 White, A., Tull, D., Johns, K., Withers, S. G., Rose, D. R. (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**, 149-154
- 99 Burmeister, W. P., Cottaz, S., Driguez, H., Iori, R., Palmieri, S., Henrissat, B. (1997) *Structure* **5**, 663-675
- 100 Notenboom, V., Birsan, C., Warren, R. A. J., Withers, S. G., Rose, D. R. (1998) *Biochemistry* **37**, 4751-4758
- 101 Cutfield, S. M., Davies, G. J., Murshudov, G., Anderson, B. F., Moody, P. C. E., Sullivan, P. A., Cutfield, J. F. (1999) *J. Mol. Biol.* **294**, 771-783
- 102 Sulzenbacher, G., Mackenzie, L. F., Wilson, K. S., Withers, S. G., Dupont, C., Davies, G. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 4826-4833
- 103 Uitdehaag, J. C. M., Mosi, R., Kalk, K. H., van der Veen, B. A., Dijkhuizen, L., Withers, S. G., Dijkstra, B. W. (1999) *Nat. Struct. Biol.* **6**, 432-436
- 104 Ducros, V., Charnock, S. J., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dauter, Z., Dupont, C., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D., Davies, G. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 23020-23026
- 105 Hrmova, M., De Gori, R., Smith, B. J., Fairweather, J. K., Driguez, H., Varghese, J. N., Fincher, G. B. (2002) *Plant Cell* **14**, 1-22
- 106 Varrot, A., Davies, G. J. (2003) *Acta Cryst.* **D59**, 447-452
- 107 Burmeister, W. P., Cottaz, S., Rollin, P., Vasella, A., Henrissat, B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 39385-39393
- 108 Jensen, M. H., Mirza, O., Albenne, C., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., Gajhede, M., Skov, L. K. (2004) *Biochemistry* **43**, 3104-3110
- 109 Mikami, B., Iwamoto, H., Malle, D., Yoon, H-Y., Dermikan-Sarikaya, E., Mezaki, Y., Katsuya, Y. (2006) *J. Mol. Biol.* **359**, 690-707
- 110 Czjzek, M., David, A. B., Bravman, T., Shoham, G., Henrissat, B., Shoham, Y. (2005) *J. Mol. Biol.* **353**, 838-846
- 111 Barends, T. R. M., Bultema, J. B., Kaper, T., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B. W. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 17242-17249
- 112 Amaya, M. F., Watts, A. G., Damager, I., Wehenkel, A., Nguyen, T., Buschlazzo, A., Raris, G., Frasch, A. C., Withers, S. G., Alzari, P. M. (2004) *Structure* **12**, 775-784

- 113 Chuenchor, W. P., S., Robinson, R. C., Yuvaniyama, J., Oonanant, W., Bevan, D. R., Esen, A., Chen, C-J., Opassiri, R., Svasti, J., Ketudat C., James R. (2008) *J. Mol. Biol.* **377**, 1200-1215
- 114 Watts, A. G., Oppezzo, P., Withers S. G., Alzari, P. M., Buschiazzo, A. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 4149-4155
- 115 Sidhu, G., Withers, S. G., Nguyen, N. T., McIntosh, L. P., Ziser, L., Brayer, G. D. (1999) *Biochemistry* **38**, 5346-5354
- 116 Sabini, E., Sulzenbacher, G., Dauter, M., Dauter, Z., Jorgensen, P. L., Schulein, M., Dupont, C., Davies, G. J., Wilson, K. S. (1999) *Chem. Biol.* **6**, 483-492
- 117 Joshi, M. D., Sidhu, G., Pot, I., Brayer, G. D., Withers, S. G., McIntosh, L. P. (2000) *J. Mol. Biol.* **299**, 255-279
- 118 Sabini, E., Wilson, K. S., Danielsen, S., Schuelein, M., Davies, G. J. (2001) *Acta Cryst.* **D57**, 1344-1347
- 119 Numao, S., Kuntz, D. A., Withers, S. G., Rose, D. R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48074-48083
- 120 Lovering, A. L., Lee, S. S., Kim, Y., Withers, S. G., Strynadka, N. C. J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 2105-2115
- 121 Sulzenbacher, G., Bignon, C., Nishimura, T., Tarling, C. A., Withers, S. G., Henrissat, B., Bourne, Y. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 13119-13128
- 122 Tews, I., Terwisscha van Scheltinga, A. C., Perrakis, A., Wilson, K. S., Dijkstra, B. W. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7954-7959
- 123 Tsai, L.-C., Shyur, L.-F., Cheng, Y.-S., Lee, S.-H. (2005) *J. Mol. Biol.* **354**, 642-651
- 124 Golan, G., Shallom, D., Teplitsky, A., Zaide, G., Shulami, S., Baasov, T., Stojanoff, V., Thompson, A., Shoham, Y., Shoham, G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 3014-3024
- 125 Sulzenbacher, G., Schülein, M., Davies, G. J. (1997) *Biochemistry* **36**, 5902-5911
- 126 Fushinobu, S., Hidaka, M., Honda, Y., Wakagi, T., Shoun, H., Kitaoka, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 17180-17186
- 127 Pell, G., Taylor, E. J., Gloster, T., Turkenburg, J. P., Fontes, C., Ferreira, L. M. A., Nagy, T., Clark, S. J., Davies G. J., Gilbert H., J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 9597-9605
- 128 Schmidt, A., Guebitz, G. M., Kratky, C. (1999) *Biochemistry* **38**, 2403-2412
- 129 Dauter, Z., Dauter, M., Brzozowski, A. M., Christensen, S., Borchert, T. V., Beier, L., Wilson, K. S., Davies, G. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 8385-8392
- 130 Skov, L. K., Mirza, O., Sprogoe, D., Dar, I., Remaud-Simeon, M., Albenne, C., Monsan, P., Gajhede, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 47741-47747
- 131 Robert, X., Haser, R., Mori, H., Svensson, B., Aghajari, N. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 32968-32978
- 132 Vujicic-Zagar, A., Dijkstra, B. W. (2006) *Acta Cryst.* **F62**, 716-721
- 133 Uitdehaag, J. C. M., van Alebeek, G. W. M., van der Veen, B. A., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B. W. (2000) *Biochemistry* **39**, 7772-7780
- 134 Roujeinikova, A., Raasch, C., Burke, J., Baker, P. J., Liebl, W., Rice, D. W. (2001) *J. Mol. Biol.* **312**, 119-131
- 135 Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W., Boot, R. G., Aerts, J. M. F. G., and van Aalten, D. M. F. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 25537-25544
- 136 Williams, S. J., Mark, B. L., Vocadlo, D. J., James, M. N. G., Withers, S. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 40055-40065

- 137 Weaver, L. H., Grütter, M. G., Matthews, B. W. (1995) *J. Mol. Biol.* **245**, 54-68
- 138 Jahn, M., Stoll, D., Warren, R. A. J., Szabo, L., Singh, P., Gilbert H., J., Ducros, V. M. A., Davies G. J., Withers S. G. (2003) *Chem. Commun.*, 1327-1329
- 139 Rojas, A. L., Nagem, R. A. P., Neustroev, K. N., Adamska, M. A. M., Eneyskaya, E. V., Kulminskaya, A. A., Garratt, R. C., Golubev, A. M., Polikarpov, I. (2004) *J. Mol. Biol.* **343**, 1281-1292
- 140 Strynadka, N. C., James, M. N. (1991) *J. Mol. Biol.* **220**, 401-424
- 141 Divne, C., Stahlberg, J., Teeri, T. T., Jones, T. A. (1998) *J. Mol. Biol.* **275**, 309-325
- 142 Varrot, A., Schuelein, M., Pipelier, M., Vasella, A., Davies, G. J. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2621-2622
- 143 Michel, G., Chantalat, L., Duee, E., Barbeyron, T., Henrisst, B., Kloareg, B., Dideberg, O. (2001) *Structure* **9**, 513-525
- 144 Wicki, J., Schloegl, J., Tarling, C. A., Withers, S. G. (2007) *Biochemistry* **46**, 6996-7005
- 145 Stoddart, J. F. (1971) *Stereochemistry of carbohydrates*, Wiley-Interscience, Toronto
- 146 Mark, B. L., Vocadlo, D. J., Knapp, S., Triggs-Raine, B. L., Withers, S. G., James, M. N. G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 10330-10337
- 147 Andrews, S. R., Charnock, S. J., Lakey, J. H., Davies, G. J., Claeysens, M., Nerinckx, W., Underwood, M., Sinnott, M. L., Warren, R. A. J., Gilbert, H. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 23027-23033
- 148 Dias, F. M. V., Vincent, F., Pell, G., Prates, J. A. M., Centeno, M. S. J., Tailford, L. E., Ferreira, L. M. A., Fontes, C. M. G. A., Davies, G. J., Gilbert, H. J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 25517-25526
- 149 Gaiser, O. J., Piotukh, K., Ponnuswamy, M. N., Planas, A., Borriss, R., Heinemann, U. (2006) *J. Mol. Biol.* **357**, 1211-1225
- 150 Biarnes, X., Nieto, J., Planas, A., Rovira, C. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 1432-1441
- 151 Parrish, F. W., Perlin, A. S., Reese, E. T. (1960) *Can. J. Chem.* **38**, 2094-2104
- 152 Anderson, M. A., Stone, B. A. (1975) *FEBS Lett.* **52**, 202-207
- 153 Woodward, J. R., Fincher, G. B., Stone, B. A. (1983) *Carbohydr. Polym.* **3**, 207-225
- 154 Buliga, G. S., Brant, D. A., Fincher, G. B. (1986) *Carbohydr. Res.* **157**, 139-156
- 155 Stone, B. A., Clarke, A. J. (1992) *Chemistry and Biology of 1,3-β-Glucans*, La Trobe University Press, Bundoora, Australia
- 156 Malet, C., Jiménez-Barbero, J., Bernabé, M., Brosa, C., Planas, A. (1993) *Biochem. J.* **296**, 753-758
- 157 Heinemann, U., Ay, J., Gaiser, O., Muller, J. J., Ponnuswamy, M. N. (1996) *Biol. Chem.* **377**, 447-454
- 158 Imberty, A. (1997) *Curr. Opin. Struc. Biol.* **7**, 617-623
- 159 Kogelberg, H., Solís, D., Jimenez-Barbero, J. (2003) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 646-653
- 160 Hrmova, M., Fincher, G. B. (2001) *Plant Mol. Biol.* **47**, 73-91
- 161 Ryttersgaard, C., Lo Leggio, L., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Larsen, S. (2002) *Biochemistry* **41**, 15135-15143
- 162 Lo Leggio, L., Kalogiannis, S., Eckert, K., Teixeira, S. C. M., Bhat, M. K., Andrei, C., Pickersgill, R. W., Larsen, S. (2001) *FEBS Lett.* **509**, 303-308

- 163 Fincher, G. B., Lock, P. A., Morgan, M. M., Lingelbach, K., Wettenhall, R. E. H., Mercer, J. F. K., Brandt, A., Thomson, K. K. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2081-2085
- 164 Litts, J. C., Simmons, C. R., Karrer, E. E., Huang, N., Rodriguez, R. L. (1990) *Eur. J. Biochem.* **194**, 831-838
- 165 Borris, R., Manteuffel, R., Hofemeister, J. (1988) *J. Basic Microbiol.* **28**, 1-10
- 166 Bueno, A., Vazquez de Aldana, C. R., Correa, J., Villa, T. G., del Rey, R. (1990) *Mol. Gen. Genet.* **222**, 278-283
- 167 Gosalbes, M. J., Perez-Gonzalez, J. A., Gonzalez, R., Navarro, A. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 7705-7710
- 168 Hofemeister, J., Kurtz, J., Borriss, R., Knowles, J. (1986) *Gene* **49**, 177-187
- 169 Lloberas, J., Querol, E., Bernués, J. (1988) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 32-38
- 170 Murphy, N., McConnell, D. J. M., Cantwell, B. A. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 5355-5367
- 171 Tzuka, H., Yuuki, T., Yabuuchi, S. (1989) *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2335-2339
- 172 Louw, M. E., Reid, S. J., Watson, T. G. (1993) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 507-513
- 173 Taberner, C., Coll, P.M., Fernandez-Abalos, J. M., Perez, P., Santamaria, R. I. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1213-1220
- 174 Yang, P., Shi, P., Wang, Y., Bai, Y., Meng, K., Luo, H., Yuan, T., Yao, B. (2007) *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 58-66
- 175 Teather, R. M., Erfle, J. D. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 3837-3841
- 176 Flint, H. J., Martin, J., McPherson, C. A., Daniel, A. S., Zhang, J.-X. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 2943-2951
- 177 Schimming, S., Schwarz, W. H., Staudenbauer, W. L. (1992) *Eur. J. Biochem.* **204**, 13-19
- 178 Zverlov, V. V., Velikodvorskaya, G. A. (1990) *Biotechnol. Lett.* **12**, 811-816
- 179 Spilliaert, R., Hreggbidsson, G. O., Kristjansson, J. K., Eggertsson, G., Palsdottir, A. (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**, 923-930
- 180 Chen, H., Li, X.-L., Ljungdahl, L. G. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 6028-6034
- 181 Celestino, K. R., Cunha, R. B., Felix, C. R. (2006) *BMC Biochem.* **7**, 23
- 182 Sun, L., Gurnon, J. R., Adams, B. J., Graves, M. V., van Etten, J. L. (2000) *Virology* **276**, 27-36
- 183 Keitel, T., Simon, O., Borriss, R., Heinemann, U. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5287-5291
- 184 Heinemann, H., Hahn, M. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 349-350
- 185 Müller, J. J., Thomsen, K. K., Heinemann, U. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 3438-3446
- 186 Hahn, M., Olsen, O., Borris, R., Heinemann, U. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 3081-3088
- 187 Hahn, M., Keitel, T., Heinemann, U. (1995) *Eur. J. Biochem.* **232**, 849-858
- 188 Tsai, L.-C., Shyur, L.-F., Lin, S.-S., Yuan, H. S. (2001) *Acta Cryst.* **D57**, 1303-1306
- 189 Keitel, T., Meldgaard, M., Heinemann, U. (1994) *Eur. J. Biochem.* **222**, 203-214
- 190 Welfle, K., Misselwitz, R., Welfle, H., Politz, O., Borriss, R. (1995) *Eur. J. Biochem.* **229**, 726-735
- 191 Varghese, J. N., Garrett, T. P. J., Colman, P. M., Chen, L., Hoj, P. B., Fincher, G. B. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2785-2789

- 192 Planas, A., Juncosa, M., Cayetano, A., Querol, E. (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 583-589
- 193 Planas, A., Juncosa, M., Lloberas, J., Querol, E. (1992) *FEBS Lett.* **308**, 141-145
- 194 Querol, E., Padrós, E., Juncosa, M., Planas, A., Lloberas, J. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 612-617
- 195 Juncosa, M., Pons, J., Planas, A., Querol, E. (1994) *Biotechniques* **16**, 820-824
- 196 Juncosa, M., Pons, J., Dot, T., Querol, E., Planas, A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14530-14535
- 197 Bernabé, M., Jiménez-Barbero, J., Planas, A. (1994) *J. Carbohydr. Chem.* **13**, 799-817
- 198 Malet, C., Viladot, J.-L., Ochoa, A., Gállego, B., Brosa, C., Planas, A. (1995) *Carbohydr. Res.* **274**, 285-301
- 199 Pons, J., Planas, A., Querol, E. (1995) *Protein Eng.* **8**, 939-945
- 200 Malet, C., Vallés, J., Bou, J., Planas, A. (1996) *J. Biotechnol.* **48**, 209-219
- 201 Moreau, V., Viladot, J.-L., Samain, E., Planas, A., Driguez, H. (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **4**, 1849-1855
- 202 Pons, J., Querol, E., Planas, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13006-13012
- 203 Viladot, J.-L., Moreau, V., Planas, A., Driguez, H. (1997) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2383-2387
- 204 Hrmova, M., Fincher, G. B., Viladot, J.-L., Planas, A., Driguez, H. (1998) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 3571-3576
- 205 Viladot, J.-L., Stone, B. A., Driguez, H., Planas, A. (1998) *Carbohydr. Res.* **311**, 95-99
- 206 Malet, C., Planas, A. (1997) *Biochemistry* **36**, 13838-13848
- 207 Viladot, J.-L., de Ramon, E., Durany, O., Planas, A. (1998) *Biochemistry* **37**, 11332-11342
- 208 Planas, A., Millet, O., Palasí, J., Pallarés, C., Abel, M., Viladot, J.-L. (1998) *Carbohydr. Res.* **310**, 53-64
- 209 Querol, E., Pons, J., Cedano, J., Vallmitjana, M., Garcia, F., Bonet, C., Perez-Pons, J., Planas, A., Mozo-Villarias, A. (1998) in *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (Ballesteros, A., Plou, F. J., Iborra, J. L., Halling, P., ed.), pp. 303-310, Elsevier, Amsterdam
- 210 Malet, C., Planas, A. (1998) *FEBS Letters* **440**, 208-212
- 211 Planas, A., Viladot, J.-L., Faijes, M. (1999) in *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering* (Gilbert H., J., Davies, G. J., Henrissat, B., Svensson, B., ed.), pp. 292-301, Royal Society of Chemistry, Cambridge
- 212 Piotukh, K., Serra, V., Borris, R., Planas, A. (1999) *Biochemistry* **38**, 16092-16104
- 213 Viladot, J.-L. (1999) *Tesi doctoral, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull*
- 214 Viladot, J.-L., Canals, F., Batllori, X., Planas, A. (2001) *Biochemical Journal* **355**, 79-86
- 215 Abel, M., Planas, A., Christensen, U. (2001) *Biochem. J.* **357**, 195-202
- 216 Faijes, M., Fairweather, J. K., Driguez, H., Planas, A. (2001) *Chem. Eur. J.* **7**, 4651-4655
- 217 Fairweather, J. K., Faijes, M., Driguez, H., Planas, A. (2002) *ChemBioChem* **3**, 866-873
- 218 Faijes, M., Perez, X., Perez, O., Planas, A. (2003) *Biochemistry* **42**, 13304-13318

- 219 Planas, A., Nieto, J., Abel, M., Segade, A. (2003) *Biocatalysis and Biotransformation* **21**, 223-231
- 220 Abel, M., Iversen, K., Planas, A., Christensen, U. (2003) *Biochem. J.* **371**, 997-1003
- 221 Faijes, M., Imai, T., Bulone, V., Planas, A. (2004) *Biochemical Journal* **380**, 635-641
- 222 Dot, T. (1998) Tesi doctoral, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull
- 223 Malet, C. (1995) Tesi doctoral, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull
- 224 Brameld, K. A., Goddard III, W. A. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3571-3580
- 225 Vasella, A., Davies, G. J., Boehm, M. (2002) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 619-629
- 226 Pons, J., Planas, A., Juncosa, M., Querol, E. (1995) in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (White, R. B. A., ed.), pp. 209-230, Humana Press Inc., Totowa, NJ
- 227 Penalva, L. O. F., Valcàrcel, J. (2000) research.bmn.com. Biomednet, TTO
- 228 Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M. D., Cortopassi, G., Galas, D. J. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 6545-6551
- 229 Kniazeva, M., Zawistowski, J. (2000) research.bmn.com. Biomednet, TTO
- 230 Pons, J. (1996) Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona
- 231 van Tilbeurgh, H., Claeysens, M., de Bruyne, C. K. (1982) *FEBS Lett.* **149**, 152-156
- 232 van Tilbeurgh, H., Pettersson, G., Bhikabhai, R., de Boeck, H., Claeysens, M. (1985) *Eur. J. Biochem.* **148**, 329-334
- 233 van Tilbeurgh, H., Loontjens, F. G., de Bruyne, C. K., Claeysens, M. (1988) *Methods Enzymol.* **160**, 45-49
- 234 Claeysens, M., van Tilbeurgh, H., Kamerling, J. P., Berg, J., Vranska, M., Biely, P. (1990) *Biochem. J.* **270**, 251-256
- 235 Cupples, C. G., Miller, J. H., Huber, R. E. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 5512-5518
- 236 Tomme, P., Chavaux, S., Béguin, P., Millet, J., Aubert, J. P., Claeysens, M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10313-10318
- 237 Moscatelli, E. A., Hamm, E. A., Rickes, E. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 2858-2862
- 238 Königs, W., Knorr, E. (1901) *Chem. Ber.* **34**, 957-981
- 239 Toshima, K., Tatsuta, K. (1993) *Chem. Rev.* **93**, 1503-1531
- 240 Davis, B. G. (2000) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2137-2160
- 241 Juaristi, E., Cuevas, G. (1992) *Tetrahedron* **48**, 5019-5087
- 242 Edward, J. T. (1955) *Chem. Ind.*, 1102-1104
- 243 Verley, A., Bosling, F. (1901) *Chem. Ber.* **34**, 3354-3358
- 244 Fischer, E., Bergmann, M. (1917) *Chem. Ber.* **50**, 1047-1069
- 245 Haynes, L., Newth, F. H. (1955) *Adv. Carbohydr. Chem.* **10**, 207-256
- 246 Dess, D., Kleine, H. P., Weinberg, D. V., Kaufman, R. J., Sidhu, R. S. (1981) *Synthesis*, 883-885
- 247 Zemplen, G., Pascu, E. (1929) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **62**, 1613-1614
- 248 Zemplen, G., Gerecs, A. (1930) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **63**, 2720-2729
- 249 Ballardie, F., Capon, B., Sutherland, J., Cocker, D., Sinnott, M. (1973) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2418-2419
- 250 Koeners, H. J., de Kok, A. J., Romers, C., van Boom, J. H. (1980) *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **99**, 355-362
- 251 Sharma, S. K., Corrales, G., Penadés, S. (1995) *Tetrahedron Lett.* **36**, 5627-5630

- 252 Excoffier, G., Gagnaire, D., Utile, J.-P. (1975) *Carbohydr. Res.* **39**, 368-373
- 253 Danishefsky, S. J., Bilodeau, M. T. (1996) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**, 1380-1419
- 254 Fischer, E., Zach, K. (1913) *Sitzungsberichte der Königlich Preussischen Akademie der Wissenschaften* **16**, 311-317
- 255 Helferich, B. (1952) *Adv. Carbohydr. Chem.* **7**, 209-245
- 256 Ness, R. K., Fletcher, H. G. Jr. (1963) *J. Org. Chem.* **28**, 435-437
- 257 Eitelman, S. J., Jordaan, A. (1977) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 552-553
- 258 Ireland, R. E., Wilcox, C. S., Thaisrivongs, S. (1978) *J. Org. Chem.* **43**, 786-787
- 259 Csuk, R., Fürstner, A., Glänzer, B. I., Weidmann, H. (1986) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1149-1150
- 260 Pollon, J. H., Llewellyn, G., Williams, J. M. (1989) *Synthesis*, 758-759
- 261 Fernandez-Mayoralas, A., Marra, A., Trumtel, M., Veyrieres, A., Sinay, P. (1989) *Carbohydr. Res.* **188**, 81-95
- 262 Fernandez-Mayoralas, A., Marra, A., Trumtel, M., Veyrieres, A., Sinay, P. (1989) *Tetrahedron Lett.* **30**, 2537-2540
- 263 Fürstner, A., Weidmann, H. (1988) *J. Carbohydr. Chem.* **7**, 773-783
- 264 Maran, F., Vianello, E. (1989) *Electrochim. Acta* **34**, 587-589
- 265 Somsák, L., Németh, I. (1993) *J. Carbohydr. Chem.* **12**, 679-684
- 266 Lancelin, J. M., Morin-Allory, L., Sinay, P. (1984) *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 355-356
- 267 Helferich, B., Mulcahy, E. N., Ziegler, H. (1954) *Chem. Ber.* **87**, 233-237
- 268 Holla, E. W. (1989) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28**, 220-221
- 269 Hanessian, S., Banoub, J. (1977) *Carbohydr. Res.* **53**, 13-16
- 270 Helferich, B., Ost, W. (1962) *Chem. Ber.* **95**, 2612-2615
- 271 Schimdt, R. R., Michel, J. (1980) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **19**, 731-732
- 272 Ferrier, R. J. (1964) *J. Chem. Soc.*, 5443-5449
- 273 Miller, J. C., Miller, J. N. (1993) *Estadística para Química Analítica*, Wilmington
- 274 Araujo, P. W., Brereton, R. G. (1996) *Trends Anal. Chem.* **15**, 63-70
- 275 Spencer, R. P., Cavallaro, C. L., Schwartz, J. (1996) *Tetrahedron Lett.* **37**, 4357-4360
- 276 Spencer, R. P., Cavallaro, C. L., Schwartz, J. (1999) *J. Org. Chem.* **64**, 3987-3995
- 277 RajanBabu, T. V., Nugent, W. A. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 986-997
- 278 Hansen, T., Krintel, S. L., Daasbjerg, K., Skrydstrup, T. (1999) *Tetrahedron Lett.* **40**, 6087-6090
- 279 Thiem, J., Klaffke, W. (1990) *Top. Curr. Chem.* **154**, 285-332
- 280 Kirschning, A., Bechtold, A. F. W., Rohr, J. (1997) *Top. Curr. Chem.* **188**, 1-84
- 281 Marzabadi, C. H., Franck, R. W. (2001) *Tetrahedron* **56**, 8385-8417
- 282 Ramesh, S., Kaila, N., Grewal, G., Franck, R. W. (1990) *J. Org. Chem.* **55**, 5-7
- 283 Roush, W. R., Lin, X.-F. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2236-2250
- 284 Gervay, J., Danishefsky, S. J. (1991) *J. Org. Chem.* **56**, 5448-5451
- 285 Barton, D. H. R., Jaszberenyi, J. C. (1989) *Tetrahedron Lett.* **30**, 2619-2622
- 286 Franck, R. W., Marzabadi, C. H. (1998) *J. Org. Chem.* **63**, 2197-2208
- 287 Halcomb, R. L., Danishefsky, S. J. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 6661-6666
- 288 Roush, W. R., Sebesta, D. P., Bennett, C. E. (1997) *Tetrahedron* **53**, 8825-8836
- 289 Chaudhary, S. K., Hernandez, O. (1979) *Tetrahedron Lett.* **10**, 99-102
- 290 Corey, E. J., Venkaterswarlu, A. (1972) *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 6190-6191
- 291 Gervay, J., Hadd, M. J. (1997) *J. Org. Chem.* **62**, 6961-6967

- 292 Betelli, E., Cherubini, P., D'Andrea, P., Passacantili, P., Piancatelli, G. (1998) *Tetrahedron* **54**, 6011-6018
- 293 Gervay, J., Nguyen, T. N., Hadd, M. J. (1997) *Carbohydr. Res.* **300**, 119-125
- 294 Pauling, L. (1946) *Chem. Eng. News* **24**, 1375-1377
- 295 Jencks, W. P. (1987) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, Dover Ed., New York
- 296 Lee, Y. C. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **35**, 161-167
- 297 Lehmann, J., Schröter, E. (1972) *Carbohydr. Res.* **23**, 359-368
- 298 Wentworth, D. F., Wolfenden, R. (1974) *Biochemistry* **13**, 4715-4720
- 299 Hehre, E. J., Genghof, D. S., Sternlicht, H., Brewer, D. F. (1977) *Biochemistry* **16**, 1780-1787
- 300 Chiba, S., Brewer, C. F., Okada, G., Matsui, H., Hehre, E. J. (1988) *Biochemistry* **27**, 1564-1569
- 301 Legler, G. (1990) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **48**, 319-384
- 302 Lai, E. C. K., Withers, S. G. (1994) *Biochemistry* **33**, 14743-14749
- 303 Lai, E. C. K., Morris, S. A., Street, I. P., Withers, S. G. (1996) *Bioorg. Med. Chem.* **4**, 1929-1937
- 304 Lehmann, J., Zieger, B. (1977) *Carbohydr. Res.* **58**, 73-78
- 305 Claeysens, M., Tomme, P., Brewer, C. F., Hehre, E. J. (1990) *FEBS Lett.* **263**, 89-92
- 306 Kanda, T., Brewer, C. F., Okada, G., Hehre, E. J. (1986) *Biochemistry* **25**, 1159-1165
- 307 Weiser, W., Lehmann, J., Matsui, H., Brewer, C. F., Hehre, E. J. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **292**, 493-498
- 308 Legler, G., Roeser, K. R., Illig, H.-K. (1979) *Eur. J. Biochem.* **101**, 85-92
- 309 Roeser, K. R., Legler, G. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **657**, 321-333
- 310 Richard, J. P., McCall, D. A., Heo, C. K., Toteva, M. M. (2005) *Biochemistry* **44**, 11872-11881
- 311 Hehre, E. J., Brewer, C. F., Genghof, D. S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 5942-5950
- 312 Hehre, E. J., Kitahata, S., Brewer, D. F. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2147-2153
- 313 Kitahata, S., Chiba, S., Brewer, C. F., Hehre, E. J. (1991) *Biochemistry* **30**, 6769-6775
- 314 Viratelle, O. M., Yon, J. M. (1980) *Biochemistry* **19**, 4143-4149
- 315 Hakamata, W., Nishio, T., Oku, T. (1999) *J. Appl. Glycosci.* **46**, 459-463
- 316 Nishio, T., Hakamata, W., Kimura, A., Chiba, S., Takatsuki, A., Kawachi, R., Oku, T. (2002) *Carbohydr. Res.* **337**, 629-634
- 317 Frandsen, T. P., Palcic, M. M., Svensson, B. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**, 728-734
- 318 McIntosh, L. P., Hand, G., Johnson, P. E., Joshi, M. D., Korner, M., Plesniak, L. A., Ziser, L., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G. (1996) *Biochemistry* **35**, 9958-9966
- 319 Mildvan, A. S., Xia, Z., Azurmendi, H. F., Legler, P. M., Balfour, M. R., Lairson, L. L., Withers S. G., Gabelli, S. B., Bianchet, M. A., Amzel, L.M. (2006) *J. Mol. Struct.* **790**, 160-167
- 320 Inoue, M., Yamada, H., Yasukochi, T., Kuroki, R., Miki, T., Horiuchi, T., Imoto, T. (1992) *Biochemistry* **31**, 5545-5553
- 321 Terra, W. R., Terra, I. C. M., Ferreira, C., De Bianchi, A. G. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **571**, 79-85
- 322 Bray, M. R., Clarke, A. J. (1990) *Biochem. J.* **270**, 91-96

- 323 Mega, T., Matsushima, Y. (1983) *J. Biochem. (Tokyo)* **94**, 1637-1647
- 324 Withers, S. G., MacLennan, D. J., Street, I. P. (1986) *Carbohydr. Res.* **154**, 127-144
- 325 Withers, S. G., Percival, M. D., Street, I. P. (1989) *Carbohydr. Res.* **187**, 43-66
- 326 Namchuk, M. N., McCarter, J. D., Becalski, A., Andrews, T., Withers, S. G. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1270-1277
- 327 Jensen, H. H., Bols, M. (2006) *Acc. Chem. Res.* **39**, 259-265
- 328 Wakarchuk, W. W., Campbell, R. L., Sung, W. L., Davoodi, J., Yaguchi, M. (1994) *Protein Sci.* **3**, 467-475
- 329 Koivula, A., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Valkeajärvi, A., Claeysens, M., Teleman, O., Kleywegt, G. J., Szardenings, M., Rouvinen, J., Jones, T. A., Teeri, T. T. (1996) *Protein Eng.* **9**, 691-699
- 330 Zechel, D. L., Withers, S. G. (2000) *Acc. Chem. Res.* **33**, 11-18
- 331 Withers, S. G. (2001) *Carbohydr. Polym.* **44**, 325-337
- 332 Roberge, M., Dupont, C., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D. (1997) *Protein Eng.* **10**, 399-403
- 333 Williams, S. J., Notenboom, V., Wicki, J., Rose, D. R., Withers, S. G. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4229-4230
- 334 Zechel, D. L., Reid, S. P., Stoll, D., Nashiru, O., Warren, R. A. J., Withers, S. G. (2003) *Biochemistry* **42**, 7195-7204
- 335 Rydberg, E. H., Li, C., Maurus, R., Overall, C. M., Brayer, G. D., Withers, S. G. (2002) *Biochemistry* **41**, 4492-4502
- 336 Sakon, J., Adney, W. S., Himmel, M. E., Thomas, S. R., Karplus, P. A. (1996) *Biochemistry* **35**, 10648-10660
- 337 Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J. A., Martínez-Ripoll, M., Lequerica, J. L., Polaina, J. (1998) *J. Mol. Biol.* **275**, 491-502
- 338 Wiesmann, C., Hengstenberg, W., Schulz, G. E. (1997) *J. Mol. Biol.* **269**, 851-860
- 339 Hilge, M., Gloor, S. M., Rypniewski, W., Sauer, O., Heightman, T. D., Zimmermann, W., Winterhalter, K., Piontek, K. (1998) *Structure* **6**, 1433-1444
- 340 Kaper, T., van Heusden, H. H., van Loo, B., Vasella, A., van der Oost, J., de Vos, W. M. (2002) *Biochemistry* **41**, 4147-4155
- 341 Dale, M. P., Ensley, H. E., Kern, K., Sastry, K. A. R., Byers, L. D. (1985) *Biochemistry* **24**, 3530-3539
- 342 Bock, K., Adelhorst, K. (1990) *Carbohydr. Res.* **202**, 131-149
- 343 Rivera-Sagredo, A., Cañada, F. J., Nieto, O., Jimenez-Barbero, J., Martin-Lomas, M. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 415-422
- 344 Wolfenden, R., Kati, W. M. (1991) *Acc. Chem. Res.* **24**, 209-215
- 345 Cleland, W. W., Kreevow, M. M. (1994) *Science* **264**, 1887-1890
- 346 Gerlt, J. A., Kreevov, M. M., Cleland, W. W., Frey, P. A. (1997) *Chem. Biol.* **4**, 259-267
- 347 Fersht, A. R. (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*. 2^a edició. Freeman, San Francisco
- 348 Segel, I. (1993) *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems.*, John Willey & Sons. Inc., Estats Units
- 349 Liu, H., Liang, X., Sohoel, H., Bülow, A., Bols, M. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5116-5117
- 350 Panday, N., Meyyappan, M., Vasella, A. (2000) *Helv. Chim. Acta* **83**, 513-538
- 351 Gloster, T. M., Roberts, S., Ducros, V. M. A., Perugino, G., Rossi, M., Hoos, R., Moracci, M., Vasella, A. and Davies, G. J. (2004) *Biochemistry* **43**, 6101-6109

- 352 Dowd, M. K., French, A. D., Reilly, P. J. (1994) *Carbohydr. Res.* **264**, 1-19
- 353 Biarnes, X., Ardèvol, A., Planas, A., Rovira, C., Laio, A., Parrinello, M. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10686-10693
- 354 Aleshin, A. E., Stoffer, B., Firsov, L. M., Svensson, B., Honzatko, R. B. (1996) *Biochemistry* **35**, 8319-8328
- 355 Sierks, M. R., Svensson, B. (1992) *Protein Eng.* **5**, 185-188
- 356 Sierks, M. R., Bock, K., Refn, S., Svensson, B. (1992) *Biochemistry* **31**, 8972-8977
- 357 Lemieux, R. U. (1996) *Acc. Chem. Res.* **29**, 373-380
- 358 Frandsen, T. P., Stoffer, B. B., Palcic, M. M., Hof, S., Svensson, B. (1996) *J. Mol. Biol.* **263**, 79-89
- 359 Sierks, M. R., Svensson, B. (2000) *Biochemistry* **39**, 8585-8592
- 360 Hakamata, W., Muroi, M., Nishio, T., Oku, T., Takatsuki, A. (2004) *J. Carbohydr. Chem.* **23**, 27-39
- 361 Frandsen, T. P., Lok, F., Mirgorodskaya, E., Roepstorff, P., Svensson, B. (2000) *Plant Physiol.* **123**, 275-286
- 362 Tanaka, K. S. E., Zhu, J., Huang, X., Lipari, F., Bennet, A. J. (2000) *Can. J. Chem.* **78**, 577-582
- 363 Hakamata, W., Nishio, T., Oku, T. (2000) *Carbohydr. Res.* **324**, 107-115
- 364 Nishio, T., Miyake, Y., Tsujii, H., Hakamata, W., Kodokura, K., Oku, T. (1996) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 2038-2042
- 365 Knegt, R. M. A., Strokopytov, B., Penninga, D., Faber, O. G., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B. W. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29256-29264
- 366 Stahlberg, J., Divne, C., Koivula, A., Piens, K., Claeysens, M., Teeri, T. T., Jones, T. A. (1996) *J. Mol. Biol.* **264**, 337-349
- 367 Strokopytov, B., Penninga, D., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B. W. (1995) *Biochemistry* **34**, 2234-2240
- 368 Krengel, U., Dijkstra, B. W. (1996) *J. Mol. Biol.* **263**, 70-78
- 369 Quian, M., Haser, R., Buisson, G., Duée, E., Payan, F. (1994) *Biochemistry* **33**, 6284-6294
- 370 Fersht, A. R., Shi, J., Knill-Jones, J., Lowe, D. M., Wilkinson, A. J., Blow, D. M., Brick, P., Carter, P., Waye, M. M. Y., Winter, G. (1985) *Nature* **314**, 235-238
- 371 Street, I. P., Armstrong, C. R., Withers, S. G. (1986) *Biochemistry* **25**, 6021-6027
- 372 Street, I. P., Rupitz, K., Withers, S. G. (1989) *Biochemistry* **28**, 1581-1587
- 373 Lawson, S. L., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G. (1996) *Biochemistry* **35**, 10110-10118
- 374 Lawson, S. L., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G. (1997) *Biochemistry* **36**, 2257-2265
- 375 Somogyi, M. (1945) *J. Biol. Chem.* **160**, 61-68
- 376 Nelson, N. (1944) *J. Biol. Chem.* **153**, 375-380
- 377 Quijoch, F. A., Spurlino, J. C., Rodseth, L. E. (1997) *Structure (London)* **5**, 997-1015
- 378 Fernandez-Alonso, M. C., Canada, F. J., Jimenez-Barbero, J., Cuevas, G. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 7379-7386
- 379 Davis, A. M., Teague, S. J. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 736-749
- 380 Frandsen, T. P., Palcic, M. M., Svensson, B., Dupont, C., Svensson, B. (1998) *Carbohydr. Res.* **314**, 127-133

- 381 Muraki, M., Harata, K. (1999) *Biochemistry* **38**, 540-548
- 382 Muraki, M., Harata, K. (2003) *J. Mol. Recog.* **16**, 72-82
- 383 Ubhayasekera, W., Muñoz, I, Vasella, A., Stahlberg, J., Mowbray, S. L. (2005) *FEBS J.* **272**, 1952-1964
- 384 Biarnés, X. (2007) Tesi doctoral. Universitat de Barcelona
- 385 Cleland, W. W. (1977) *Adv. Enzymol.* **45**, 273-387
- 386 Johnson, K. A. (1992) in *The Enzymes*. 3^a ed., vol. 20 (Boyer, P. D., ed.), pp. 1-61, Academic Press, New York
- 387 Fierke, C. A., Hammes, G. G. (1995) *Methods Enzymol.* **249**, 3-37
- 388 Roughton, F. J. W. (1934) *Proc. R. Soc. Lond., B* **115**, 473-495
- 389 Chance, B. (1940) *J. Franklin Inst.* **229**, 455-476, 613-640, 737-766
- 390 Farina, R. D., Wilkins, R. G. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **631**, 428-438
- 391 Williams, T. J., Shafer, J. A., Goldstein, I. J. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 8533-8537
- 392 Williams, T. J., Shafer, J. A., Goldstein, I. J., Adamson, T. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 8538-8544
- 393 van Landschoot, A., Loontjens, F. G., De Bruyne, C. K. (1978) *Eur. J. Biochem.* **83**, 277-285
- 394 van Landschoot, A., Loontjens, F. G., De Bruyne, C. K. (1980) *Eur. J. Biochem.* **103**, 307-312
- 395 van Landschoot, A., Loontjens, F. G., Clegg, R. M., Jovin, T. M. (1980) *Eur. J. Biochem.* **103**, 313-321
- 396 Gray, R. D., Glew, R. H. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 7547-7551
- 397 Clegg, R. M., Loontjens, F. G., Jovin, T. M. (1977) *Biochemistry* **16**, 167-175
- 398 Loontjens, F. G., Clegg, R. M., van Landschoot, A., Jovin, T. M. (1977) *Eur. J. Biochem.* **78**, 465-469
- 399 Hiromi, K., Takahashi, K., Hamazu, Z., Ono, S. (1966) *J. Biochem. (Tokyo)* **59**, 469-475
- 400 Hiromi, K., Kawai, M., Ono, S. (1966) *J. Biochem. (Tokyo)* **59**, 476-480
- 401 Hiromi, K., Ohnishi, M., Tanaka, A. (1983) *Mol. Cell. Biochem.* **51**, 79-95
- 402 Sierks, M. R., Ford, C., Reilly, P. J., Svensson, B. (1989) *Protein Eng.* **2**, 621-625
- 403 Meagher, M. M., Nikolov, Z. L., Reilly, P. J. (1989) *Biotech. Bioeng.* **34**, 681-688
- 404 Clarke, A. J., Svensson, B. (1984) *Carlsberg Res. Commun.* **49**, 559-566
- 405 Hiromi, K., Ohnishi, M., Yamashita, T. (1974) *J. Biochem.* **76**, 1365-1367
- 406 Tanaka, A., Ohnishi, M., Hiromi, K. (1982) *Biochemistry* **21**, 107-113
- 407 Ohnishi, M., Yamashita, T., Hiromi, K. (1977) *J. Biochem.* **81**, 99-105
- 408 Christensen, U., Olsen, K., Svensson, B. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 777-784
- 409 Olsen, K., Christensen, U., Sierks, M. R., Svensson, B. (1993) *Biochemistry* **32**, 9686-9693
- 410 Christensen, U., Olsen, K., Stoffer, B., Svensson, B. (1996) *Biochemistry* **35**, 15009-15018
- 411 Christensen, T., Stoffer, B., Svensson, B., Christensen, U. (1997) *Eur. J. Biochem.* **250**, 638-645
- 412 Natarajan, S. K., Sierks, M. R. (1996) *Biochemistry* **35**, 3050-3058
- 413 Natarajan, S. K., Sierks, M. R. (1996) *Biochemistry* **35**, 15269-15279
- 414 Natarajan, S. K., Sierks, M. R. (1997) *Biochemistry* **36**, 14946-14955
- 415 Sierks, M. R., Svensson, B. (1996) *Biochemistry* **35**, 1865-1871
- 416 Sierks, M. R., Sico, C., Zaw, M. (1997) *Biotechnol. Progr.* **13**, 601-608

- 417 Christensen, U. (2000) *Biochem. J.* **349**, 623-628
- 418 Olsen, K., Svensson, B., Christensen, U. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 777-784
- 419 Sierks, M. R., Svensson, B. (1994) *Protein Eng.* **7**, 1479-1484
- 420 Frandsen, T. P., Dupont, C., Lehmbeck, J., Stoffer, B., Sierks, M. R., Honzatko, R. B., Svensson, B. (1994) *Biochemistry* **33**, 13808-13816
- 421 Selwood, T., Sinnott, M. L. (1990) in *Molecular Mechanisms in Biorganic Processes* (Golding, B. T., & Bleasdale, C., ed.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, England
- 422 Ohnishi, H., Matsumoto, H., Sakai, H., Ohta, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 3503-3510
- 423 Tanaka, A., Ito, M., Hiromi, K. (1986) *J. Biochem.* **100**, 1379-1385
- 424 Halford, S. E. (1975) *Biochem. J.* **149**, 411-422
- 425 Banerjee, S. K., Holler, E., Hess, G. P., Rupley, J. A. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 4355-4367
- 426 Fink, A. L., Angelides, K. J. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**, 701-708
- 427 Deschavanne, P. J., Viratelle, O. M., Yon, J. M. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1892-1896
- 428 Li, B. F. L., Osborne, S., Sinnott, M. L. (1983) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 365-369
- 429 Wang, Q., Trimbur, D., Graham, R., Warren, R. A. J., Withers, S. G. (1995) *Biochemistry* **34**, 14554-14562
- 430 Savel'ev, A. N., Ibatyllin, F. M., Eneyskaya, E. V., Kachurin, A. M., Neustroev, K. N. (1996) *Carbohydr. Res.* **296**, 261-273
- 431 Charnock, S. J., Lakey, J. H., Virden, R., Hughes, N., Sinnott, M. L., Hazlewood, G., Pickersgill, R., Gilbert, H. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 2942-2951
- 432 Joshi, M. D., Sidhu, G., Nielsen, J. E., Brayer, G. D., Withers, S. G., McIntosh, L. P. (2001) *Biochemistry* **40**, 10115-10139
- 433 Jones, C. S., Kosman, D. J. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 11861-11869
- 434 MacLeod, A. M., Tull, D., Rupitz, K., Warren, R. A. J., Withers, S. G. (1996) *Biochemistry* **35**, 13165-13172
- 435 Bravman, T., Mechaly, A., Shulami, S., Belakhov, V., Baasov, T., Shoham, G., Shoham, Y. (2001) *FEBS Lett.* **495**, 115-119
- 436 Withers, S. G., Rupitz, K., Trimbur, D., Warren, R. A. J. (1992) *Biochemistry* **31**, 9979-9985
- 437 Genta, F. A., Dumont, A. F., Marana, S. R., Terra, W. R., Ferreira, C. (2007) *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **1774**, 1079-1091
- 438 Kadziola, A., Sogaard, M., Svensson, B., Haser, R. (1998) *J. Mol. Biol.* **278**, 205-217
- 439 Allouch, J., Helbert, W., Henrissat, B., Czjzek, M. (2004) *Structure* **12**, 623-632
- 440 Robert, X., Haser, R., Gottschalk, T.E., Ratajczak, F., Driguez, H., Svensson, B., Aghajari, N. (2003) *Structure* **11**, 973-984
- 441 Schmidt, A., Schlacher, A., Steiner, W., Schwab, H., Kratky, C. (1998) *Protein Sci.* **7**, 2081-2088
- 442 Sevcik, J., Hostinova, E., Solovicova, A., Gasperik, J., Dauter, Z., Wilson, K. S. (2006) *FEBS J.* **273**, 2161-2171
- 443 Ouellet, L., Stewart, J. A. (1959) *Can. J. Chem.* **37**, 737-743
- 444 Waley, S. G. (1991) *Biochem. J.* **279**, 87-94

- 445 Kiener, P. A., Knott-Hunziker, V., Petursson, S., Waley, S. G. (1980) *Eur. J. Biochem.* **109**, 575-580
- 446 Frère, J. (1981) *Biochem. Pharmacol.* **30**, 549-552
- 447 Persaud, K. C., Pain, R. H., Virden, R. (1986) *Biochem. J.* **237**, 723-740
- 448 Fink, A. L., Behner, K. M., Tan, A. K. (1987) *Biochemistry* **26**, 4248-4258
- 449 Escobar, W. A., Tan, A. K., Lewis, E. R., Fink, A. L. (1994) *Biochemistry* **33**, 7619-7626
- 450 Zawadzke, L. E., Chen, C. C. H., Banerjee, S., Li, Z., Wäsch, S., Kapadia, G., Moul, J., Herzberg, O. (1996) *Biochemistry* **35**, 16475-16482
- 451 Toney, M. D., Kirsch, J. F. (1989) *Science* **243**, 1485-1488
- 452 Toney, M. D., Kirsch, J. F. (1992) *Protein Sci.* **1**, 107-119
- 453 Nath, R. L., Rydon, H. N. (1954) *Biochem. J.* **57**, 1-10
- 454 Hall, A. N., Hollingshead, S., Rydon, H. N. (1961) *J. Chem. Soc.*, 4290-4295
- 455 Capon, B. (1971) *Biochimie* **53**, 145-149
- 456 Richard, J. P., Westerfeld, J. G., Lin, S. (1995) *Biochemistry* **34**, 11703-11712
- 457 De Bruyne, C. K., Wouters-Leysen, J., Yde, M. (1973) *Carbohydr. Res.* **29**, 387-396
- 458 Dookhun, V., Bennet, A. J. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 7458-7465
- 459 Ashwell, M., Guo, X., Sinnott, M. L. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10158-10166
- 460 Jones, C. C., Sinnott, M. L. Souchard, I. J. L. (1977) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1191-1198
- 461 Chou, D. T. H., Watson, J. N., Scholte, A. A., Borgford, T. J., Bennet, A. J. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 8357-8364
- 462 Craze, G.-A., Kirby, A. J. (1978) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 354-356
- 463 Piskiewicz, D., Bruice, T. C. (1968) *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 2156-2163
- 464 Jensen, J. L., Wuhrman, W. B. (1983) *J. Org. Chem.* **48**, 4686-4691
- 465 Jensen, J. L., Herold, L. R., Lenz, P. A., Trusty, S., Sergi, V., Bell, K., Rogers, P. (1979) *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 4672-4677
- 466 Li, Y., Chir, J., Chen, F. (2001) *Biochem. J.* **355**, 835-840
- 467 Hansch, C., Klein, T. E. (1991) *Methods Enzymol.* **202**, 512-516
- 468 Planas, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1543**, 361-382
- 469 Burton, J., Sinnott, M. L. (1983) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 359-364
- 470 Guo, X., Laver, W. G., Vimr, E., Sinnott, M. L. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5572-5578
- 471 Watson, J. N., Knoll, T. L., Chen, J. H., Choum D. T. H., Borgford, T. J., Bennet, A. J. (2005) *Biochem. Cell Biol.* **83**, 115-122
- 472 Tsai, C. S., Tang, J. Y., Subbarao, S. C. (1969) *Biochem. J.* **114**, 529-534
- 473 Tsai, C. S. (1997) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **29**, 325-334
- 474 Wang, C.-C. and Touster, O. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 2650-2656
- 475 Vallmitjana, M., Ferrer-Navarro, M., Planell, R., Abel, M., Ausin, C., Querol, E., Planas, A., Perez-Pons, J.-A. (2001) *Biochemistry* **40**, 5975-5982
- 476 Chang, Y., Zajicek, J., Castellino, F. J. (1997) *Biochemistry* **36**, 7652-7663
- 477 Perraut, C., Clottes, E., Leydier, C., Vial, C., Marcillat, O. (1998) *Proteins* **32**, 43-51
- 478 Skoging, U., Liljestrom, P. (1998) *J. Mol. Biol.* **279**, 865-872
- 479 Chauthaiwale, J., Rao, M. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1204**, 164-168
- 480 Maranville, E., Zhu, A. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 1495-1501
- 481 Strokopytov, B., Knegt, R. M. A., Penninga, D., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B. W. (1996) *Biochemistry* **35**, 4241-4249

- 482 Brzozowski, A. M., Davies, G. J. (1997) *Biochemistry* **36**, 10837-10845
- 483 Gilles, C., Astier, J. P., Marchis-Mouren, G., Cambillau, C., Payan, F. (1996)
Eur. J. Biochem. **238**, 561-569
- 484 Parsiegla, G., Juy, M., Reverbel-Leroy, C., Tardif, C., Belaïch, J., Driguez, H.,
Haser, R. (1998) *EMBO J.* **17**, 5551-5562
- 485 Juy, M., Amrt, A. G., Alzari, P. M., Poljak, R. J., Claeysens, M., Beguin, P.,
Aubert, J.-P. (1992) *Nature* **357**, 89-91
- 486 Withers, S. G., Rupitz, K. (1990) *Biochemistry* **29**, 6405-6409
- 487 Bauer, M. W., Kelly, R. M. (1998) *Biochemistry* **37**, 17170-17178
- 488 Perez-Pons, J. A., Cayetano, A., Rebordosa, X., Lloberas, J. Guasch, A., Querol,
E. (1994) *Eur. J. Biochem.* **223**, 557-565
- 489 Montero, E. (1998) Tesi doctoral, Universidad Complutense de Madrid
- 490 Cheron, G., Noat, G., Ricard, J. (1990) *Biochem. J.* **269**, 389-392
- 491 Frieden, C. (1979) *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 471-489
- 492 Neet, K. E., Ainslie, G. R. (1980) *Methods Enzymol.* **64**, 192-226
- 493 Kipper, K., Våljamäe, P., Johansson, G. (2005) *Biochem. J.* **385**, 527-535
- 494 Varrot, A., MacDonald, J., Stick, R. V., Pell, G., Gilbert, H. J., Davies, G. J.
(2003) *Chem. Commun.*, 946-947
- 495 Mikami, B., Degano, M., Hehre, E. J., Sacchettini, J. C. (1994) *Biochemistry* **33**,
7779-7787
- 496 Varrot, A., Schülein, M., Davies, G. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 8884-8891
- 497 Armand, S., Drouillard, S., Schülein, M., Henrissat, B., Driguez, H. (1997) *J.*
Biol. Chem. **272**, 2709-2713
- 498 Henrissat, B. (1998) *Cellulose Commun.* **5**, 84-90
- 499 Stahlberg, J., Johansson, G., Pettersson, G. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*
1157, 107-113
- 500 Amano, Y., Shiroishi, M., Nisizawa, K., Hoshino, E., Danda, T. (1996) *J.*
Biochem. **120**, 1123-1129
- 501 Boisset, C., Armand, S., Drouillard, H., Chanzy, H., Driguez, H., Henrissat, B.
(1998) in *Carbohydrases from Trichoderma reesei and Other Microorganisms*
(M. Claeysens, K. P., W. Nerinckxs, ed.), pp. 124-132, Royal Society of
Chemistry, London
- 502 Sikorski, P., Sorbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H., Varum, K. M. (2006)
Biochemistry **45**, 9566-9574
- 503 Reverbel-Leroy, C., Pagès, S., Belaïch, A., Belaïch, J. P., Tardif, C. (1997) *J.*
Bacteriol. **179**, 46-52
- 504 Zhang, S., Wilson, D. B. (1997) *J. Biochem.* **57**, 101-113
- 505 Barr, B. K., Wolfgang, D. E., Piens, K., Claeysens, M., Wilson, D. B. (1998)
Biochemistry **37**, 9220-9229
- 506 Hrmova, M., Fincher, G. B. (2007) *Carbohydr. Res.* **342**, 1613-1623
- 507 Robyt, J. F., French, D. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 8-16
- 508 Robyt, J. F., French, D. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* **138**, 662-670
- 509 Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K. C., Jones, T. A. (1990)
Science **249**, 380-386
- 510 Watanabe, T., Ishibshi, A., Ariga, Y., Hashimoto, M., Nikaidou, N., Sugiyama,
J., Matsumoto, T., Nonaka, T. (2001) *FEBS Lett.* **494**, 74-78
- 511 Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J., Watanabe,
T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 41343-41349
- 512 Zhou, W., Irwin, D. C., Escovar-Kousen, J., Wilson, D. B. (2004) *Biochemistry*
43, 9655-9663

Bibliografia

- 513 von Ossowski, I., Stahlberg, J., Koivula, A., Piens, K., Becker, D., Boer, H., Harle, R., Harris, M., Divne, C., Mahdi, S., Zhao, Y., Driguez, H., Claeysens, M., Sinnott, M. L., Teeri, T. T. (2003) *J. Mol. Biol.* **333**, 817-829
- 514 Horn, S. J., Sorbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sorlie, M., Varum, K. J., Eijsink, V. G. H. (2006) *FEBS J.* **273**, 491-503
- 515 Szedlaczek, S. E., Duggleby, R. G., Vlad, M. O. (1991) *Biochem. J.* **279**, 855-861
- 516 Törrönen, A., Harkki, A., Rouvinen, J. (1994) *EMBO J.* **13**, 2493-2501
- 517 Teather, R. M., Wood, P. J. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 777-780
- 518 Landt, O., Grunnert, H. P., Hahn, U. (1990) *Gene* **96**, 125-128
- 519 Gill, S. C., von Hippel, P. H. (1989) *Anal. Biochem.* **182**, 319-326
- 520 Lloberas, J., Pérez-Pons, J. A., Querol, E. (1991) *Eur. J. Biochem.* **197**, 337-343
- 521 Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- 522 Park, J. T., Johnson, M. J. (1949) *J. Biol. Chem.* **181**, 149-151
- 523 Miller, G. L. (1959) *Anal. Chem.* **31**, 426-428
- 524 Breuil, C., Saddler, J. N. (1985) *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 449-450