

Apèndix 1. Cinètiques en estat preestacionari amb proteïnes que uneixen carbohidrats

A continuació es presenten dos exemples d'aplicació de cinètiques d'estat preestacionari en el cas de proteïnes que uneixen carbohidrats. Amb aquests dos exemples es vol mostrar, d'una banda, que arribar a la deducció d'un mecanisme enzimàtic a partir de les cinètiques en estat preestacionari no és sempre un procés directe i senzill, i de l'altra, que per tal d'arribar a proposar un mecanisme satisfactori generalment s'ha de recórrer als resultats obtinguts amb altres tècniques o metodologies.

A1.1. Concanavalina A

La concanavalina A és una lectina (proteïna sense activitat catalítica que uneix carbohidrats) capaç d'enllaçar diferents monosacàrids, i com a conseqüència pot unir-se a superfícies cel·lulars on té importants propietats biològiques. Al 1980 es realitzen una sèrie de cinètiques d'unió en estat preestacionari amb monosacàrids derivatitzats [1], en què es mesura la variació d'absorbància o fluorescència del lligand. En tots els casos les cinètiques són monoexponencials i com a conseqüència s'arriba a la conclusió que la unió es dona en una única etapa bimolecular (figura A1.1).

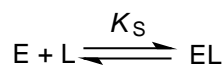


Figura A1.1. Esquema proposat per a la unió del lligand per part de la concanavalina A a partir dels resultats obtinguts amb monosacàrids derivatitzats.

D'altra banda, estudiant el fenomen d'unió amb lligands de diferent grau de polimerització es comprova que la unió del monosacàrid presenta una cinètica monoexponencial, la del disacàrid una biexponencial, i la del trisacàrid una triexponencial [2, 3]. El fet que s'hagi pogut distingir els diferents complexos comporta que les cinètiques d'establiment dels diferents equilibris, i/o les propietats òptiques associades a cada complex són clarament diferenciables. Aquests resultats indiquen que la unió de lligands a la concanavalina A és més complexa del que s'havia pensat en un primer moment. Com el més general és que els lligands de la mateixa família tinguin un mecanisme d'unió comú, els diferents grups estudien dos models diferents per tal d'explicar els resultats obtinguts amb els diferents substrats. El primer suposa una unió ràpida proteïna-lligand, seguida d'un o més canvis conformacionals lents del complex inicial format (model A de la figura A1.2). La segona implica una sèrie d'etapes ràpides i indistingibles ($k_{\text{associació}}$ ràpides) de formació de diferents complexos proteïna-lligand (tants com unitats de monòmer conformin el lligand), seguides per un establiment lent de l'equilibri poblacional dels diferents complexos ($k_{\text{dissociació}}$ lentes), que dona lloc a tants esdeveniments exponencials com complexos es formen (model B a la figura A1.2). En base a aquest model, i tenint en compte que la termodinàmica d'unió de diferents manooligosacàrids a la concanavalina A sembla indicar que el centre d'unió de la proteïna està format per un únic subseti [4, 5], es proposa que hi ha tantes formes d'unió, com monòmers conformen el substrat.

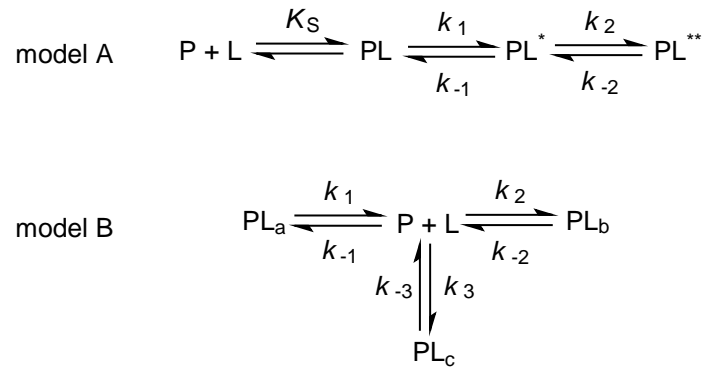


Figura A1.2. Possibles models per a la unió de la mannotriosa a la Concanavalina A, on P representa la proteïna i L, l'oligosacàrid. **Model A.:** Dues etapes de canvi conformacional segueixen a l'etapa bimolecular de formació del complex proteïna-ligand. **Model B:** Després de tres etapes ràpides i indistingibles de formació de tres complexos diferents proteïna-ligand, en què en cada cas s'uneix a la proteïna una unitat de mannopiranososa diferent, es produeixen una sèrie d'etapes lentes d'establiment de l'equilibri dels diferents complexos, donant lloc a tantes exponencials com complexos s'han format.

Si bé els dos models poden ajustar-se als resultats obtinguts a les cinètiques, els diferents grups aposten pel model B. D'una banda, amb el model A no hi ha una explicació senzilla per a la relació directa que es dona entre el nombre de canvis conformacionals i la longitud del lligand; mentre que en el model B, aquesta relació es deriva del mateix model. En aquest sentit, és particularment remarcable el fet que amb el monosacàrid la cinètica sigui sempre monoexponencial i respongui a una única etapa bimolecular, ja sigui emprant mètodes de flux interromput, o cinètiques de relaxació [1, 6-8]. Aquest és el comportament lògic per a un monosacàrid en aplicar el model B, però seguint el model A, no és obvi explicar el perquè no s'hauria de donar el canvi conformacional. Una altra dada experimental a favor del model B és que les constants de velocitat per a les diferents etapes d'associació determinades aplicant aquest model tenen uns valors comparables, que és un dels supòsits que s'assumeix en el seu plantejament.

Aquest és un exemple de com en pot arribar a ser de complexa una etapa d'unió proteïna-carbohidrat, i potser es deu precisament al fet que la concanavalina A no sigui un enzim. Els enzims estableixen preferentment l'estructura de l'estat de transició sobre l'estructura en estat fonamental dels seus lligands, amb la finalitat bàsica de catalitzar la reacció pertinent. Per tant, l'enzim busca unir fortament el seu lligand amb una estructura diferent a la que presenta en solució. En els enzims les etapes d'unió de substrat solen ser etapes bimoleculars, seguides en alguns casos de canvis conformacionals que ajuden a assolir l'estructura de l'estat de transició. Però en el cas de proteïnes que no catalitzen cap reacció, no és necessari que es doni aquesta unió forta amb el lligand. Aquestes proteïnes, com poden ser les proteïnes de reconeixement o transport, interaccionen amb l'estat fonamental del lligand i és possible que una manera d'augmentar la seva eficiència sigui desenvolupar diferents maneres de reconèixer el lligand, o tenir diferents punts d'ancoratge amb diferent afinitat.

A1.2. Glucoamilasa

La glucoamilasa és una exohidrolasa que hidrolitza unitats de D-glucopiranososa de l'extrem no reductor del midó i poli- i oligosacàrids relacionats, amb preferència per a la hidròlisi d'enllaços α -1,4 sobre els α -1,6 [9, 10]. El seu centre actiu està format per set subsetis, sis per l'extrem reductor i un per l'extrem no-reductor [11-13]. En el marc de l'estudi mecanístic d'aquest enzim, diferents grups van complementar els estudis en estat estacionari amb estudis en estat preestacionari amb glucoamilases de diferents famílies o espècies. Aprofitant la presència de diversos triptòfans implicats en les interaccions amb substrats i inhibidors [11, 12, 14, 15], causant disminucions i augments de la fluorescència intrínseca de l'enzim, en els experiments de flux interromput precisament han mesurat aquests canvis de fluorescència. Els primers estudis es van realitzar amb la glucoamilasa de *Rhizopus niveus*, aprofundint en la hidròlisi de maltodextrines [16] i maltosa [17] i la unió de l'inhibidor gluconolactona [17, 18]; en tots els casos s'observen cinètiques monoexponencials, en què la k_{obs} mostra una dependència creixent amb la concentració de lligand fins arribar a saturació. Les cinètiques s'interpreten com una primera etapa bimolecular ràpida d'unió enzim-ligand, seguida d'una etapa lenta d'isomerització, que és on es dona el canvi de fluorescència observat, seguides per les etapes catalítiques en el cas dels substrats.

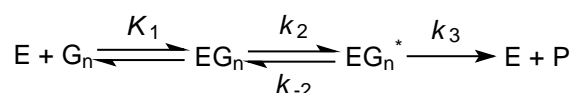


Figura A1.3. Mecanisme catalític proposat per a la glucoamilasa de *Rhizopus niveus*, on G_n representen els substrats de diferent grau de polimerització, EG_n el complex enzim-substrat no productiu, i EG_n^* , el complex productiu. K_1 i $K_2 = k_2/k_{-2}$, són les constants d'equilibri de l'etapa bimolecular i unimolecular, respectivament, i la k_3 és la constant de velocitat de l'etapa catalítica. En el cas dels inhibidors el mecanisme s'acaba després de la formació d' EG_n^* .

Els resultats indiquen que en la primera etapa el lligand s'uneix a l'enzim feblement i en la segona etapa la unió es fa més forta. Tot i que la naturalesa de la isomerització pot ser una relocalització del substrat dins del centre actiu, un canvi conformacional de l'enzim o un canvi conformacional del substrat, els autors [11] es decanten per una resituació del substrat. Aquest, en una primera etapa, s'uniria a l'enzim de forma no productiva en el subseti +1, que per estudis de mapatge de centre actiu és el que té una major afinitat per substrat, i després s'acabaria unint al centre actiu a partir del subseti -1 en endavant, formant el complex productiu (figura A1.4).

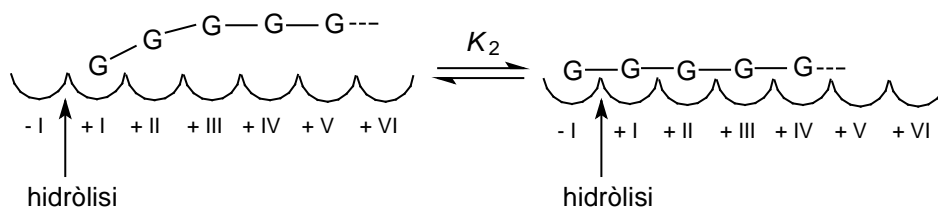


Figura A1.4. Model d'unió de lligands a la glucoamilasa proposat per Hiromi *et al.*

En els estudis amb la glucoamilasa d'*Aspergillus niger* també s'avalua la unió d'un inhibidor, la gluconolactona [19], i de diferents substrats [19, 20] per variació de la fluorescència intrínseca de l'enzim. Es comprova que la unió de maltooligosacàrids de grau de polimerització entre 2 i 5 es caracteritza pel mateix mecanisme descrit per Hiromi *et al.*, en què després d'una etapa d'unió enzim-substrat feble hi ha una etapa unimolecular que genera un complex enzim-substrat fortament unit. Ara bé, aquests autors discrepen respecte del model d'unió proposat en el cas de la glucoamilasa de *Rhizopus niveus*. Argumenten que si el subseti +1 és, de lluny, el que presenta una major afinitat per lligand no té sentit que el primer complex que es genera, amb unió en aquest subseti, sigui feble, i que després, el reposicionament a altres subsetis, que no tenen una contribució significativa en l'afinitat per substrat [11], provoqui l'enfortiment de la interacció. Per contra, proposen que l'etapa bimolecular comporta unió al subseti -1, o conjuntament als subsetis -1 i +1 (donat que el darrer és el que mostra una major afinitat per substrat segons el mapatge del centre actiu), formant el complex productiu en aquesta primera etapa, i que l'etapa unimolecular posterior, és un canvi conformacional, que és el responsable de l'enfortiment de la unió [19]. Més endavant, tant el grup de Svensson *et al.*, realitzant l'anàlisi de diferents mutants del centre actiu de la glucoamilasa [21, 22], com Natarajan i Sierks, basant-se en la comparació de les constants d'associació (K_1) per a la unió de glucosa i maltosa en estat preestacionari [23], troben que en l'estat fonamental el subseti -1 presenta major afinitat per substrat que el subseti +1, contradient els resultats de mapatge del centre actiu de Hiromi en què s'havien basat tots els estudis anteriors. D'aquesta manera els dos grups donen suport a la proposta d'unió productiva seguida de canvi conformacional, i a més presenten com a model més probable l'opció d'unió inicial al subseti -1 (model **a** de la figura A1.5). Proposen que després d'una primera interacció feble, el canvi conformacional posterior augmenta l'afinitat per substrat dels subsetis de l'extrem reductor.

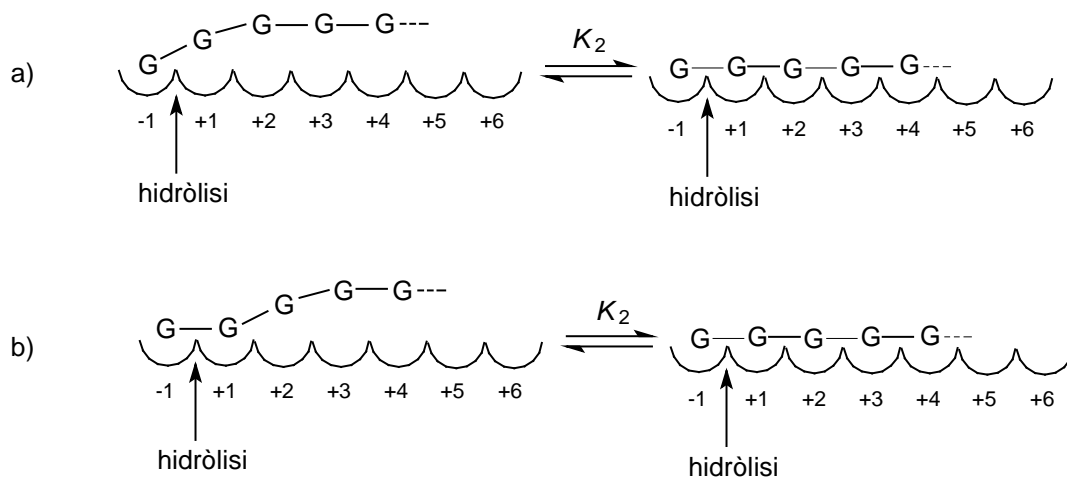


Figura A1.5. Models d'unió proposats per a la glucoamilasa per Svensson *et al.* **a)** Unió inicial al subseti -1 i canvi conformacional posterior. **b)** Unió inicial als subsetis -1 i +1 i canvi conformacional posterior.

Una altra conclusió a la que s'arriba amb la glucoamilasa d'*Aspergillus niger* és que no tots els lligands s'uneixen a l'enzim fent servir aquest mecanisme bàsic. Així, a diferència del mecanisme d'hidròlisi de la maltosa, el de la isomaltosa implica una etapa addicional. Els resultats de les cinètiques en estat preestacionari són similars en el cas

dels dos substrats, però la divergència entre el valor de la K_d calculada a partir del canvi de fluorescència en estat preestacionari, i el de la K_M calculada en estat estacionari, essent aquesta darrera un ordre de magnitud inferior, és indicatiu d'una etapa addicional de canvi conformacional en el mecanisme proposat [19] (figura A1.6).

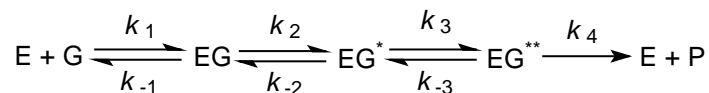


Figura A1.6. Model proposat per a la unió de la isomaltosa a la glucoamilasa d'*Aspergillus niger* en què després d'una primera etapa bimolecular d'unió enzim-substrat, es donen dues etapes consecutives de canvi conformacional.

Svensson *et al.* proposen encara un tercer mecanisme per a la unió de l'inhibidor gluconolactona. La k_{obs} segueix una dependència hiperbòlica amb la concentració d'inhibidor, igual que havia observat el grup de Hiromi *et al.*, però la dependència dels valors d'equilibri de la variació de fluorescència $-\Delta F(G, \infty)$ amb la concentració d'inhibidor no es correspon amb la unió d'una sola molècula de lligand. Generalment, en les cinètiques en estat preestacionari no s'avalua la dependència de la magnitud de la fase d'acumulació amb la concentració de lligand, ja que les equacions són molt més complexes que les de k_{obs} , però una inspecció a nivell qualitatiu pot aportar informació interessant, com és el cas de la unió de la gluconolactona a la glucoamilasa. Les anàlisis de la magnitud de la fase d'acumulació s'ajusten a un model que implica la interacció independent de dues molècules d'inhibidor amb la glucoamilasa. Una d'aquestes aparentment és una associació ràpida en què la gluconolactona s'uneix feblement, mentre que l'altra, comporta una associació ràpida seguida per un canvi conformacional. A la figura A1.7 es presenta el model proposat pel grup de Svensson per a la unió de la gluconolactona a la glucoamilasa d'*Aspergillus niger*.

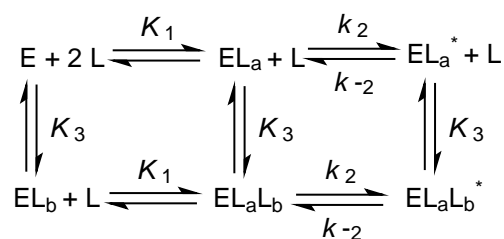


Figura A1.7. Model d'unió de la gluconolactona a la glucoamilasa d'*Aspergillus niger*.

Un tercer grup de treball realitza cinètiques en estat preestacionari amb la glucoamilasa d'*Aspergillus awamori*. Com una part dels seus estudis mecanístics, avaluen els efectes isotòpics de dissolvent tant en estat estacionari com en estat preestacionari, comparant les velocitats de reacció en H_2O i D_2O [24]. Aquestes investigacions són particularment útils per a l'estudi de mecanismes en què es dona una o més transferències de protó, sempre i quan l'etapa determinant de la velocitat de reacció sigui la de transferència de protó. A l'igual que en els estudis ja esmentats, observen que la traça de la cinètica de reacció en estat preestacionari s'ajusta a una monoexponencial, i que la dependència de la k_{obs} amb la concentració de substrat és hiperbòlica. El plantejament global del

mecanisme és, per tant, igual al que s'havia fet fins al moment: una primera etapa d'unió enzim-substrat, seguida d'una etapa d'equilibri i finalment una darrera etapa irreversible. La novetat que introdueix aquest grup és la interpretació que fan de les diferents etapes de la reacció. Fins al moment s'havia proposat que l'etapa lenta en la catàlisi de la glucoamilasa era l'etapa d'hidròlisi, i que les dues etapes prèvies corresponien a la formació del complex de Michaelis. Natarajan i Sierks proposen que l'etapa lenta correspon a l'alliberament del producte de reacció, de manera que es forma el complex de Michaelis a la primera etapa i assignen la segona etapa al procés hidrolític (figura A1.8). No descarten que es puguin donar etapes de canvis conformacionals unides a la unió del substrat, però aquestes serien massa ràpides per poder-les distingir de la primera etapa d'unió.

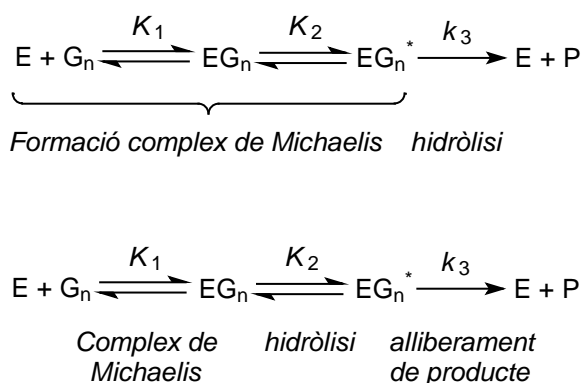


Figura A1.8. Mecanismes proposats per a la hidròlisi de substrats per part de la glucoamilasa. A dalt, mecanisme proposat pels grups de Hiromi i Svensson. A baix, mecanisme proposat per Natarajan i Sierks.

L'evidència que l'etapa lenta és la d'alliberament del producte es basa en cinètiques en estat estacionari amb l'enzim salvatge i diferents mutants de la glucoamilasa d'*Aspergillus awamori*, fent servir com a substrats el fluorur d' α -glicosil i diversos oligosacàrids [25, 26], i es ratifica més tard mesurant la velocitat de reacció amb solvents de diferent viscositat [27]. Es comprova que si bé les mutacions no influeixen en els paràmetres cinètics per a la hidròlisi del fluorur d' α -glicosil, si que ho fan en la hidròlisi dels oligosacàrids, de manera que les k_{cat} d'alguns mutants són molt inferiors a les de l'enzim salvatge. En la reacció amb el fluorur de glicosil es considera que l'etapa d'alliberament de producte pot obviar-se, ja que el fluorur (que és el producte de la reacció d'hidròlisi) difon al medi de forma immediata. Per tant, la manca de variació de la velocitat d'hidròlisi del fluorur de glicosil entre els diferents enzims, s'interpreta en el sentit que les mutacions estudiades no afecten l'etapa catalítica. Seguint el raonament, si l'etapa hidrolítica no es veu afectada per les mutacions ha d'haver una etapa associada a la hidròlisi del substrat que és la que disminueix de velocitat en els diferents mutants, i s'associa a la d'alliberament del producte d'hidròlisi. A més, comproven que en la hidròlisi de maltosa per part de l'enzim salvatge no s'observa un efecte isotòpic significatiu sobre la k_{cat} , que és un resultat indicatiu que l'etapa determinant de la reacció no és l'etapa hidrolítica. Així doncs, si k_3 és l'etapa d'alliberament del producte de reacció, la K_2 només pot ser la constant d'equilibri de l'etapa d'hidròlisi. En les cinètiques en estat preestacionari tant la k_2 com la k_{-2} disminueixen a la meitat en D_2O respecte de les velocitats respectives en H_2O , la qual cosa quadra amb la reversibilitat microscòpica de la reacció hidrolítica, i confirma que la hidròlisi té lloc en aquesta etapa.

El mecanisme proposat per Natarajan i Sierks no està acceptat per tota la comunitat científica, que opina que tot i les proves aportades, n'hi ha d'altres que contradiuen aquest mecanisme [21, 22, 28]. Les opinions contràries es basen en tres tipus de resultats diferents. D'una banda, posen en dubte que l'alliberament del producte de reacció sigui l'etapa lenta donada la poca afinitat que té la glucoamilasa per la glucosa [11], que és el producte de reacció. D'altra banda, el fet que les cinètiques en estat preestacionari de diferents mutants, que afecten en diferent mesura l'activitat enzimàtica en estat estacionari, no impliqui una disminució important de les constants de velocitat de la segona etapa (que si fos l'etapa hidrolítica hauria de seguir els canvis que s'observen en l'estat estacionari) [20-22, 29], aixeca dubtes respecte que la segona etapa es tracti de l'etapa hidrolítica. Finalment, el fet que el perfil de k_{cat} amb el pH en estat estacionari segueixi la ionització dels residus catalítics [9, 30, 31], com correspondria si l'etapa determinant de la velocitat de reacció fos l'etapa d'hidròlisi, contradiu una etapa lenta d'alliberament del producte; a més, el mateix perfil de pH en estat preestacionari mostra que no hi ha variació significativa de les constants de velocitat de la segona etapa en canviar l'estat de protonació del residu que actua com a àcid general [28]. De fet, en el cas de la glucoamilasa d'*Aspergillus niger* la disminució de k_{cat} a la meitat en presència de D_2O , indica que per a aquest enzim, l'etapa hidrolítica és l'etapa determinant de la velocitat de reacció [32].

Finalment, hi ha un quart grup que estudia les cinètiques de la glucoamilasa de *Clostridium* sp. G0005. Les cinètiques en estat preestacionari de l'enzim salvatge amb maltotriosa mostren dues relaxacions, primer una disminució ràpida de fluorescència seguida d'un augment lent [33]. El fet que hi hagi dues relaxacions tan ben diferenciades indica que al mecanisme hi ha més de dues etapes. Els autors descarten que l'augment de la intensitat de fluorescència sigui degut a l'etapa hidrolítica. De manera que en aquesta glucoamilasa els resultats s'ajusten a un model amb una etapa addicional abans de l'etapa hidrolítica (figura A1.9), de forma similar al que es proposa per a la hidròlisi de la isomaltosa en el cas de la glucoamilasa d'*Aspergillus niger* [19]. En alguns mutants de l'enzim de *Clostridium* no s'observa la segona exponencial, i en aquests casos es proposa que l'etapa bimolecular està seguida per un únic canvi intramolecular lent d'un complex enzim-substrat a un altre.

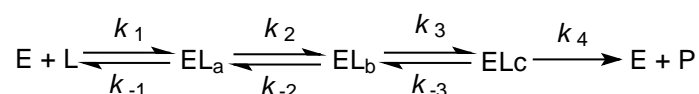


Figura A1.9. Mecanisme proposat per a la glucoamilasa de *Clostridium*, en què els complexos EL_a , EL_b i EL_c són diferents conformacions del complex enzim-substrat.

El cas de la glucoamilasa és un exemple clar de com poden arribar a ser d'importants les dades addicionals provinents d'experiments d'estat estacionari per tal d'interpretar els resultats en estat preestacionari (en aquest cas, el mapatge del centre actiu, els estudis amb diferents mutants i substrats, la dependència de les constants cinètiques amb el pH i la viscositat, i els estudis d'efectes isotòpics). Malgrat tots aquests resultats, els diferents grups no es posen d'acord, i continua havent-hi bàsicament dues interpretacions del mecanisme senzill de tres etapes. El fet que els arguments exposats en contra del mecanisme proposat per Natarajan i Sierks no s'hagin obtingut a partir dels resultats

obtinguts amb la glucoamilasa d'*Aspergillus awamori*, sinó d'altres subespècies, fa possible que sobre el mecanisme bàsic de tres etapes, comunament acceptat per tots els grups, la velocitat relativa de les diferents etapes de reacció variï en funció de l'espècie o família, de manera que totes les propostes siguin correctes. A més, el fet que la glucoamilasa de *Clostridium* o la mateixa glucoamilasa d'*Aspergillus niger* mostrin etapes addicionals i formes d'unió alternatives en funció del lligand, fa pensar en un mecanisme obert, que permet adaptar-se a les diferents circumstàncies en cada cas.

A1.3. Bibliografia

- 1 Farina, R. D., Wilkins, R. G. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **631**, 428-438
- 2 Williams, T. J., Shafer, J. A., Goldstein, I. J., Adamson, T. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 8538-8544
- 3 van Landschoot, A., Loontjens, F. G., Clegg, R. M., Jovin, T. M. (1980) *Eur. J. Biochem.* **103**, 313-321
- 4 van Landschoot, A., Loontjens, F. G., De Bruyne, C. K. (1978) *Eur. J. Biochem.* **83**, 277-285
- 5 van Landschoot, A., Loontjens, F. G., De Bruyne, C. K. (1980) *Eur. J. Biochem.* **103**, 307-312
- 6 Gray, R. D., Glew, R. H. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 7547-7551
- 7 Clegg, R. M., Loontjens, F. G., Jovin, T. M. (1977) *Biochemistry* **16**, 167-175
- 8 Loontjens, F. G., Clegg, R. M., van Landschoot, A., Jovin, T. M. (1977) *Eur. J. Biochem.* **78**, 465-469
- 9 Hiromi, K., Takahashi, K., Hamazu, Z., Ono, S. (1966) *J. Biochem. (Tokyo)* **59**, 469-475
- 10 Hiromi, K., Kawai, M., Ono, S. (1966) *J. Biochem. (Tokyo)* **59**, 476-480
- 11 Hiromi, K., Ohnishi, M., Tanaka, A. (1983) *Mol. Cell. Biochem.* **51**, 79-95
- 12 Sierks, M. R., Ford, C., Reilly, P. J., Svensson, B. (1989) *Protein Eng.* **2**, 621-625
- 13 Meagher, M. M., Nikolov, Z. L., Reilly, P. J. (1989) *Biotech. Bioeng.* **34**, 681-688
- 14 Clarke, A. J., Svensson, B. (1984) *Carlsberg Res. Commun.* **49**, 111-122
- 15 Clarke, A. J., Svensson, B. (1984) *Carlsberg Res. Commun.* **49**, 559-566
- 16 Hiromi, K., Ohnishi, M., Yamashita, T. (1974) *J. Biochem.* **76**, 1365-1367
- 17 Tanaka, A., Ohnishi, M., Hiromi, K. (1982) *Biochemistry* **21**, 107-113
- 18 Ohnishi, M., Yamashita, T., Hiromi, K. (1977) *J. Biochem.* **81**, 99-105
- 19 Christensen, U., Olsen, K., Svensson, B. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 777-784
- 20 Olsen, K., Christensen, U., Sierks, M. R., Svensson, B. (1993) *Biochemistry* **32**, 9686-9693
- 21 Christensen, U., Olsen, K., Stoffer, B., Svensson, B. (1996) *Biochemistry* **35**, 15009-15018
- 22 Christensen, T., Stoffer, B., Svensson, B., Christensen, U. (1997) *Eur. J. Biochem.* **250**, 638-645
- 23 Natarajan, S. K., Sierks, M. R. (1997) *Biochemistry* **36**, 14946-14955
- 24 Natarajan, S. K., Sierks, M. R. (1996) *Biochemistry* **35**, 15269-15279
- 25 Sierks, M. R., Svensson, B. (1996) *Biochemistry* **35**, 1865-1871
- 26 Natarajan, S. K., Sierks, M. R. (1996) *Biochemistry* **35**, 3050-3058

- 27 Sierks, M. R., Sico, C., Zaw, M. (1997) *Biotechnol. Progr.* **13**, 601-608
- 28 Christensen, U. (2000) *Biochem. J.* **349**, 623-628
- 29 Olsen, K., Svensson, B., Christensen, U. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 777-784
- 30 Sierks, M. R., Svensson, B. (1994) *Protein Eng.* **7**, 1479-1484
- 31 Frandsen, T. P., Dupont, C., Lehmbeck, J., Stoffer, B., Sierks, M. R., Honzatko, R. B., Svensson, B. (1994) *Biochemistry* **33**, 13808-13816
- 32 Selwood, T., Sinnott, M. L. (1990) en *Molecular Mechanisms in Biorganic Processes* (Golding, B. T., & Bleasdale, C., ed.), Royal Society of Chemistry, Cambridge. England
- 33 Ohnishi, H., Matsumoto, H., Sakai, H., Ohta, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 3503-3510

Apèndix 2. Deducció de paràmetres cinètics en estat preestacionari

A2.1 Deducció de k_{obs}

En aquest apèndix es realitza la deducció de l'expressió de la k_{obs} per als diferents mecanismes proposats en el capítol 5. Per tal de facilitar les deduccions s'ha aplicat la simplificació de considerar que, en comparació amb l'etapa lenta que dona lloc al canvi de senyal en estat preestacionari, la resta d'etapes estan en equilibri ràpid. A més es parteix de la base que a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* l'etapa de glicosidació és més lenta que la de desglicosidació ($k_2 \ll k_3$). S'ha obviat la deducció per als mecanismes senzills donat que són equacions que poden trobar-se en diferents llibres d'enzimologia [1, 2].

Model 1. Unió enzim-lligand: Mecanisme descrit per a la fase d'acumulació

En aquest mecanisme la unió d'una primera molècula de substrat comporta un canvi conformacional lent del complex enzim substrat que posteriorment uneix una altra molècula de substrat, i el canvi de senyal en estat preestacionari ve donat per la formació de les espècies ES^* i ES_2^* .

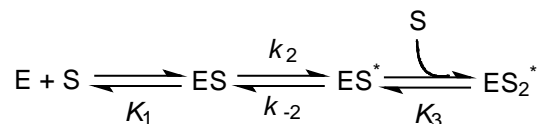


Figura A2.1. Mecanisme en què després d'una primera etapa d'unió enzim-substrat es produeix un canvi conformacional lent que fa possible la unió d'una segona molècula de substrat.

Així doncs, la velocitat de la fase preestacionària ve marcada per la variació de la concentració de les espècies ES^* i ES_2^* al llarg del temps fins assolir l'estat estacionari. Considerant que la unió de la segona molècula de substrat al complex ES^* és una etapa d'equilibri ràpid, l'etapa lenta que marca la velocitat és la formació del complex ES^* :

$$d([ES^*] + [ES_2^*]) / dt = \left(1 + \frac{[S]}{K_3}\right) \cdot d[ES^*] / dt \quad \text{Equació A2.1.}$$

$$\left(1 + \frac{[S]}{K_3}\right) \cdot d[ES^*] / dt = k_2 \cdot [ES] - (k_{-2}) \cdot [ES^*] \quad \text{Equació A2.2.}$$

La concentració total d'enzim és:

$$[E_0] = [E] + [ES] + [ES^*] + [ES_2^*] \quad \text{Equació A2.3.}$$

Considerant que les dues etapes d'unió són d'equilibri ràpid, l'equació A2.3 es transforma en:

$$[E_0] = \left(1 + \frac{K_1}{[S]}\right) \cdot [ES] + \left(1 + \frac{[S]}{K_3}\right) \cdot [ES^*] \quad \text{Equació A2.4.}$$

i substituint l'equació A2.4 en l'equació A2.2, s'arriba a:

$$\left(1 + \frac{[S]}{K_3}\right) \cdot d[ES^*]/dt = k_2 \cdot \frac{[E_0]}{1 + \frac{K_1}{[S]}} - \left(k_{-2} + k_2 \cdot \frac{1 + \frac{[S]}{K_3}}{1 + \frac{K_1}{[S]}} \right) \cdot [ES^*] \quad \text{Equació A2.5.}$$

de manera que:

$$d[ES^*]/dt = \frac{k_2 \cdot [E_0]}{\left(1 + \frac{[S]}{K_3}\right) \cdot \left(1 + \frac{K_1}{[S]}\right)} - \left(\frac{k_{-2}}{1 + \frac{[S]}{K_3}} + \frac{k_2}{1 + \frac{K_1}{[S]}} \right) \cdot [ES^*] \quad \text{Equació A2.6.}$$

integrant aquesta expressió s'obté:

$$[ES^*]_{(t)} = \frac{k_2 \cdot [E_0]}{k_{obs} \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_3}\right) \cdot \left(1 + \frac{K_1}{[S]}\right)} \cdot (1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)) \quad \text{Equació A2.7.}$$

$$\text{on } k_{obs} = \frac{k_{-2}}{1 + \frac{[S]}{K_3}} + \frac{k_2}{1 + \frac{K_1}{[S]}} \quad \text{Equació A2.8.}$$

Model 2. Cinètica de reacció: Alliberament lent de l'aglicona

Mecanisme en què es considera que l'etapa lenta és l'alliberament de l'aglicona posterior a l'etapa de glicosidació. El senyal en estat preestacionari es deu a l'acumulació de l'espècie EP·X, en què ja s'ha hidrolitzat l'enllaç glicosídic però l'aglicona continua unida al centre actiu (figura A2.2).

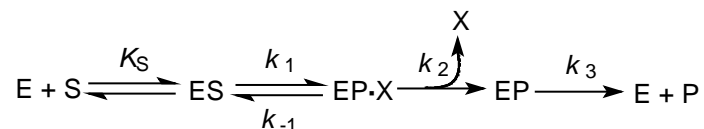


Figura A2.2. Mecanisme de retenció de configuració en què es dona una etapa lenta d'alliberament d'aglicona prèvia a l'etapa de desglicosidació.

La velocitat de les cinètiques en estat preestacionari segueixen per tant els canvis de concentració del complex EP·X.

$$d[EP \cdot X] / dt = k_1 \cdot [ES] - (k_2 + k_{-1}) \cdot [EP \cdot X] \quad \text{Equació A2.9.}$$

La concentració total d'enzim és:

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EP \cdot X] + [EP] \quad \text{Equació A2.10.}$$

Si es considera que l'etapa d'unió de substrat està en equilibri i que $k_3 \gg k_2$, llavors:

$$[E_0] = \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right) \cdot [ES] + [EP \cdot X] \quad \text{Equació A2.11.}$$

de manera que:

$$d[EP \cdot X] / dt = \frac{k_1 \cdot [E_0]}{1 + \frac{K_S}{[S]}} - \left(\frac{k_1}{1 + \frac{K_S}{[S]}} + k_{-1} + k_2\right) \cdot [EP \cdot X] \quad \text{Equació A2.12.}$$

integrant aquesta expressió s'obté:

$$[EP \cdot X]_{(t)} = \frac{k_1 \cdot [E_0]}{k_{obs} \cdot \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right)} \cdot (1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)) \quad \text{Equació A2.13.}$$

$$\text{on } k_{obs} = k_{-1} + k_2 + \frac{k_1}{1 + \frac{K_S}{[S]}} \quad \text{Equació A2.14.}$$

Model 3. Cinètica de reacció: Inhibició acompetitiva lenta

En aquest model es considera que l'etapa lenta causant de la fase d'acumulació de producte és la unió d'una segona molècula de substrat al complex ES de forma acompetitiva. La constant de velocitat de la cinètica en estat preestacionari ve definida per la variació de la concentració de l'espècie ES_2 amb el temps, fins assolir l'estat estacionari.

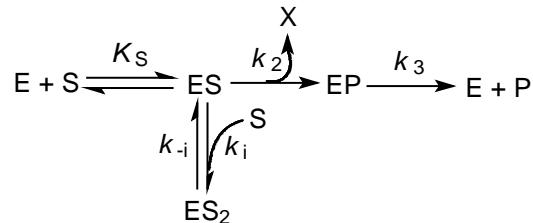


Figura A2.3. Mecanisme de retenció de configuració en què hi ha una etapa lenta de formació d'un complex abortiu de forma acompetitiva.

L'expressió de l'equació de la velocitat de reacció en estat preestacionari és:

$$d[ES_2]/dt = k_i \cdot [S] \cdot [ES] - k_{-i} \cdot [ES_2] \tag{Equació A2.15}$$

La concentració total d'enzim en aquest mecanisme és:

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EP] + [ES_2] \tag{Equació A2.16}$$

i considerant que l'etapa d'unió de substrat per tal de formar el complex de Michaelis està en equilibri i que $k_3 \gg k_2$, llavors:

$$[E_0] = \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right) \cdot [ES] + [ES_2] \tag{Equació A2.17}$$

així,

$$d[ES_2]/dt = \frac{k_i \cdot [S] \cdot [E_0]}{1 + \frac{K_S}{[S]}} - \left(\frac{k_i \cdot [S]}{1 + \frac{K_S}{[S]}} + k_{-i}\right) \cdot [ES_2] \tag{Equació A2.18}$$

integrant aquesta expressió s'obté:

$$[ES_2]_{(t)} = \frac{k_i \cdot [S] \cdot [E_0]}{k_{obs} \cdot \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right)} \cdot (1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)) \tag{Equació A2.19}$$

on la k_{obs} és:

$$k_{obs} = \frac{k_i \cdot [S]}{1 + \frac{K_s}{[S]}} + k_{-i} \quad \text{Equació A2.20.}$$

Model 4. Cinètica de reacció: Inhibició acompetitiva lenta sobre l'intermedi de reacció

Mecanisme d'inhibició acompetitiva en què l'etapa lenta resulta ser la formació del complex ternari amb l'intermedi de reacció, EP. La velocitat de la fase preestacionària ve marcada per la variació de la concentració de l'espècie EPS al llarg del temps fins assolir l'estat estacionari.

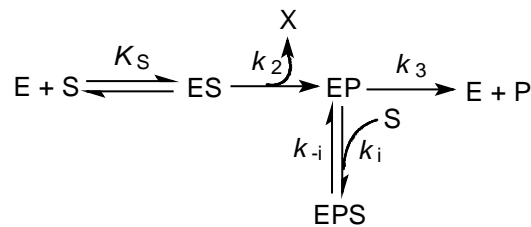


Figura A2.4. Mecanisme de retenció de configuració en què hi ha una etapa lenta de formació d'un complex abortiu de forma acompetitiva sobre l'intermedi de reacció.

L'expressió de la velocitat de reacció en estat preestacionari és funció de la concentració de l'espècie EPS:

$$d[EPS]/dt = k_i \cdot [S] \cdot [EP] - k_{-i} \cdot [EPS] \quad \text{Equació A2.21.}$$

La concentració total d'enzim en aquest mecanisme és:

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EP] + [EPS] \quad \text{Equació A2.22.}$$

i considerant que l'etapa d'unió de substrat per tal de formar el complex de Michaelis està en equilibri i que $k_3 \gg k_2$, llavors:

$$[E_0] = \left(\frac{K_s \cdot k_3}{k_2 \cdot [S]} + \frac{k_3}{k_2} + 1 \right) \cdot [EP] + [EPS] = \frac{k_3}{k_2} \left(1 + \frac{K_s}{[S]} \right) \cdot [EP] + [EPS] \quad \text{Equació A2.23.}$$

substituint [EP] a l'equació A2.22:

$$d[EPS]/dt = \frac{k_i \cdot [S] \cdot [E_0]}{\frac{k_3}{k_2} \cdot \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right)} - \left(\frac{k_i \cdot [S]}{\frac{k_3}{k_2} \cdot \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right)} + k_{-i} \right) \cdot [EPS] \quad \text{Equació A2.24.}$$

Integrant aquesta equació s'obté:

$$[EPS]_{(t)} = \frac{k_i \cdot [S] \cdot [E_0]}{\frac{k_{obs} \cdot k_3}{k_2} \cdot \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right)} \cdot (1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)) \quad \text{Equació A2.25.}$$

on la k_{obs} és:

$$k_{obs} = \frac{k_i \cdot [S]}{\frac{k_3}{k_2} \cdot \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right)} + k_{-i} \quad \text{Equació A2.26.}$$

Model 5. Cinètica de reacció: Model per als enzims actius basat en el mecanisme d'unió

Es proposa un mecanisme en què després d'un canvi conformacional inicial s'uneix una molècula de substrat de forma productiva, i que aquest complex productiu pot evolucionar cap a la hidròlisi del substrat o patir un canvi conformacional lent que permet la unió d'una segona molècula de substrat. L'equilibri entre E i E* es dona durant la fase de retardament, de manera que l'estudi de la fase d'acumulació de producte parteix de l'espècie E* i respon a la part de mecanisme marcada de color blau. Donat que per experiments en estat estacionari amb substrats amb diferent aglicona se sap que l'etapa determinant de la velocitat de reacció és la glicosidació i no la desglicosidació, la fase d'acumulació de producte respon a la formació dels complexos ES* i ES2**, de forma similar al que es planteja al model 1.

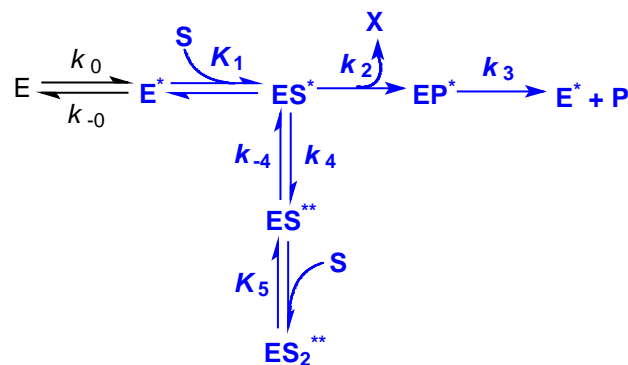


Figura A2.5. Mecanisme plantejat per a la hidròlisi de substrats sintètics per part de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*, que incorpora una etapa de canvi conformacional lent amb unió d'una segona molècula de substrat partir del complex de Michaelis. El mecanisme que descriu la fase d'acumulació de producte es marca de color blau.

El plantejament és el mateix que en el model 1: considerant que la unió de la segona molècula de substrat al complex ES^{**} és una etapa d'equilibri ràpid, l'etapa que marca la velocitat de la fase preestacionària és la formació del complex ES^{**} :

$$d([ES^{**}] + [ES_2^{**}])/dt = \left(1 + \frac{[S]}{K_5}\right) \cdot d[ES^{**}]/dt \quad \text{Equació A2.27.}$$

$$\left(1 + \frac{[S]}{K_5}\right) \cdot d[ES^{**}]/dt = k_4 \cdot [ES^*] - (k_{-4}) \cdot [ES^{**}] \quad \text{Equació A2.28.}$$

Per al mecanisme marcat amb negreta la concentració total d'enzim és:

$$[E_0] = [E^*] + [ES^*] + [EP^*] + [ES^{**}] + [ES_2^{**}] \quad \text{Equació A2.29.}$$

Considerant que les etapes d'unió són d'equilibri ràpid, i que amb una $k_3 \gg k_2$ la $[EP^*]$ es pot considerar menyspreable, la concentració total d'enzim es pot expressar com:

$$[E_0] = \left(1 + \frac{K_1}{[S]}\right) \cdot [ES^*] + \left(1 + \frac{[S]}{K_5}\right) \cdot [ES^{**}] \quad \text{Equació A2.30.}$$

i substituint l'equació A2.30 en l'equació A2.28:

$$\left(1 + \frac{[S]}{K_5}\right) \cdot d[ES^{**}]/dt = k_4 \cdot \frac{[E_0]}{1 + \frac{K_1}{[S]}} - \left(k_{-4} + k_4 \cdot \frac{1 + \frac{[S]}{K_5}}{1 + \frac{[S]}{[S]}}\right) \cdot [ES^{**}] \quad \text{Equació A2.31.}$$

de manera que:

$$d[ES^{**}]/dt = \frac{k_4 \cdot [E_0]}{\left(1 + \frac{[S]}{K_5}\right) \cdot \left(1 + \frac{K_1}{[S]}\right)} - \left(\frac{k_{-4}}{1 + \frac{[S]}{K_5}} + \frac{k_4}{1 + \frac{[S]}{[S]}}\right) \cdot [ES^{**}] \quad \text{Equació A2.32.}$$

integrant aquesta expressió s'obté:

$$[ES^{**}]_{(t)} = \frac{k_4 \cdot [E_0]}{k_{obs} \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_5}\right) \cdot \left(1 + \frac{K_1}{[S]}\right)} \cdot (1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)) \quad \text{Equació A2.33.}$$

$$\text{on } k_{obs} = \frac{k_{-4}}{1 + \frac{[S]}{K_5}} + \frac{k_4}{1 + \frac{K_1}{[S]}} \quad \text{Equació A2.34.}$$

Per a les cinètiques dels substrats que no presenten inhibició acompetitiva per substrat la $K_5 \gg [S]$, de manera que l'expressió de k_{obs} se simplifica a:

$$k_{obs} = k_{-4} + \frac{k_4}{1 + \frac{K_1}{[S]}} \quad \text{Equació A2.35.}$$

Model 6. Cinètica de reacció: Model final per als enzims actius

Mecanisme proposat en què la β -glucanasa té 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 és necessària perquè es formi el complex productiu, SES^* . A continuació les dues espècies SE^* i SES^* experimenten un canvi conformacional lent governat per k_{obs} , en què es transformen en les espècies SE^{**} (no productiva) i SES^{**} (que és inactiva o menys activa que 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 SES_2^{**}) com sobre l'intermedi de reacció SEP^* (formant el complex $SEPS^*$). En la deducció de les equacions dels paràmetres cinètics d'estat preestacionari no es té en compte la possible inhibició acompetitiva. Donat que el canvi conformacional per tal de formar l'espècie E^* es dona durant la fase de retardament, el mecanisme que s'estudia durant la fase d'acumulació, en color blau a la figura A2.6, parteix de l'espècie E^* .

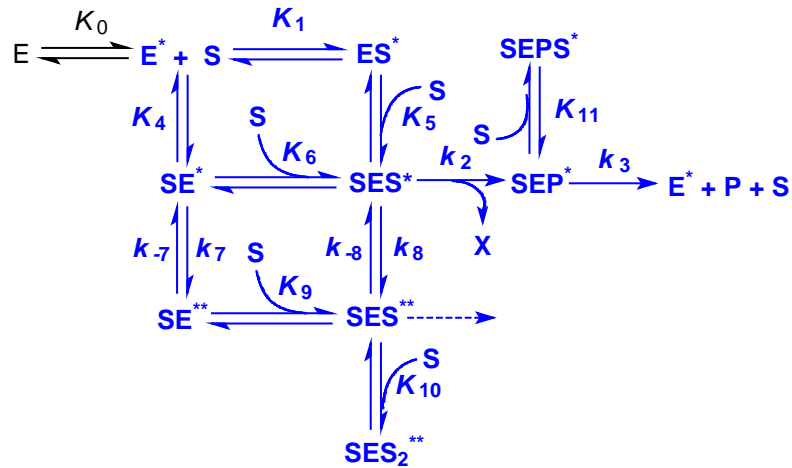


Figura A2.6. Mecanisme ramificat en què després d'un primer canvi conformacional cap a una espècie enzimàtica capaç d'unir substrat en un seti d'unió extern (E^*), els complexos SE^* i SES^* experimenten un canvi conformacional lent per tal de formar les espècies SE^{**} i SES^{**} . A més, s'inclouen possibles etapes d'inhibició acompetitiva per substrat. El mecanisme que descriu la fase d'acumulació de producte es marca en color blau.

D'acord amb aquest mecanisme, el transient que s'observa en les cinètiques en estat preestacionari correspon a l'acumulació de les espècies SE^{**} i SES^{**} . Així, la k_{obs} respon al temps de relaxació de les dues etapes de canvi conformacional, segons l'equació A2.36:

$$d([SE^{**}] + [SES^{**}])/dt = k_7 \cdot [SE^*] + k_8 \cdot [SES^*] - k_{-7} \cdot [SE^{**}] - k_{-8} \cdot [SES^{**}] \quad \text{Equació A2.36.}$$

D'altra banda, obviant la inhibició acompetitiva, la concentració total d'enzim del mecanisme marcat amb negreta respon a l'equació:

$$[E_0] = [E^*] + [ES^*] + [SE^*] + [SES^*] + [SE^{**}] + [SES^{**}] \quad \text{Equació A2.37.}$$

Assumint que l'afinitat del seti regulador per substrat és superior a la del centre actiu i que s'ha treballat a una concentració de substrat capaç de saturar el seti regulador, la concentració de l'espècie d'enzim lliure i d' ES^* són menyspreables. De manera que l'equació A2.37 se simplifica en l'equació A2.38:

$$[E_0] = [SE^*] + [SES^*] + [SE^{**}] + [SES^{**}] \quad \text{Equació A2.38.}$$

d'on:

$$d([SE^{**}] + [SES^{**}])/dt = -d([SE^*] + [SES^*])/dt \quad \text{Equació A2.39.}$$

Com $[SE^*]/[SES^*] = K_6/[S]$:

$$([SE^*] + [SES^*]) = [SES^*] \cdot (1 + K_6/[S]) = [SE^*] \cdot (1 + [S]/K_6) \quad \text{Equació A2.40.}$$

Fent una manipulació matemàtica de l'equació A2.36, sumant i restant els termes $(k_8 \cdot [SES^*])$ i $(k_{-7} \cdot [SE^*])$, s'obté l'equació A2.41:

$$d([SE^{**}] + [SES^{**}]) / dt = (k_7 + k_{-7}) \cdot [SE^*] + (k_8 + k_{-8}) \cdot [SES^*] - [k_{-7} \cdot ([SE^{**}] + [SE^*]) + k_{-8} \cdot ([SES^{**}] + [SES^*])] \quad \text{Equació A2.41.}$$

I substituint $[SE^*]$ i $[SES^*]$ en l'equació A2.41, s'obté l'equació A2.42:

$$-d([SE^*] + [SES^*]) / dt = \left(\frac{k_7 + k_{-7}}{1 + \frac{[S]}{K_6}} + \frac{k_8 + k_{-8}}{1 + \frac{K_6}{[S]}} \right) \cdot ([SE^*] + [SES^*]) - [k_{-7} \cdot ([SE^{**}] + [SE^*]) + k_{-8} \cdot ([SES^{**}] + [SES^*])] \quad \text{Equació A2.42.}$$

Si es considera que el terme que està restant és pràcticament constant, cosa que implica que $k_7 \approx k_8$, l'equació A2.42 és una equació diferencial de primer ordre senzilla, la integració de la qual porta a la següent expressió de k_{obs} :

$$k_{obs} = \frac{k_7 + k_{-7}}{1 + \frac{[S]}{K_6}} + \frac{k_8 + k_{-8}}{1 + \frac{K_6}{[S]}} \quad \text{Equació A2.43.}$$

A2.2 Bibliografia

- 1 Purich, D. L. (1996) Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism. Second edition, Academic Press, Inc., San Diego
- 2 Fersht, A. R. (1985) Enzyme Structure and Mechanism. 2ª edició. Freeman, San Francisco

Apèndix 3. Anàlisi de Hammett i glicosidases

A3.1. Equació de Hammett

L'anàlisi de Hammett té els seus orígens en la química orgànica, en l'estudi de l'efecte provocat pel canvi de naturalesa i disposició dels substituents d'un compost determinat en la seva reactivitat, avaluant d'aquesta manera els efectes inductius i mesòmers dels diferents substituents. Un dels primers casos en què es va observar una relació clara entre els canvis en l'estructura del compost i la seva reactivitat va ser amb una família d'àcids benzoics, per als que es va definir una equació que permetia explicar el comportament observat en la reacció d'ionització [1].

$$\log k - \log k_0 = \sigma \cdot \rho \quad \text{Equació A3.1.}$$

on la σ , que és la constant de substituent, es defineix com:

$$\sigma = \log K_X - \log K_H = pK_{a,H} - pK_{a,X} \quad \text{Equació A3.2.}$$

i el $pK_{a,H}$ i el $pK_{a,X}$ són els pK_a a 25 °C de l'àcid benzoic i del derivat substituït corresponent de l'àcid benzoic, respectivament. La constant de substituent representa la mesura del canvi de distribució electrònica del reactiu causat per la unió d'una cadena lateral en posicions *meta*- o *para*-. En posició *meta*- només s'avaluen els efectes inductius, mentre que en posició *para*- es contemplen tant els efectes inductius com mesòmers. En el cas de les substitucions en posició *orto*- poden donar-se efectes estèrics que dificultin la coplanarietat d'orbitals, impeding la conjugació.

Les k_0 i k de l'equació de Hammett són les constants de velocitat de ionització de l'àcid benzoic lliure i del derivat substituït corresponent de l'àcid benzoic, respectivament. Finalment 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, que 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.

A3.2. Assistència àcida enfront de trencament d'enllaç glicosídic

Les anàlisis de Hammett aplicades a glicosidases aporten informació conjunta sobre els fenòmens d'assistència protònica i de trencament d'enllaç que es donen a l'estat de transició de l'etapa de glicosidació (figura A3.1), sempre i quan aquesta etapa sigui la determinant de la velocitat de reacció. Una manera de poder determinar el grau de trencament d'enllaç per ell mateix, independentment del grau de catàlisi àcida, es basa en realitzar l'anàlisi de Hammett amb dues famílies de substrats diferents, una en què no es dona la catàlisi àcida, com són els ions *N*-glicosilpiridini (figura A3.2), i una altra en què sí que es dona, per exemple els fenil *O*-glicòsids [2, 3]. Com la cessió de protó a l'aglicona per a les sals d'*N*-glicosilpiridini és impossible estructuralment, emprant aquesta família de substrats només es mesura l'efecte de les interaccions no covalents i nucleofíliques per part de l'enzim en l'escissió de l'enllaç.

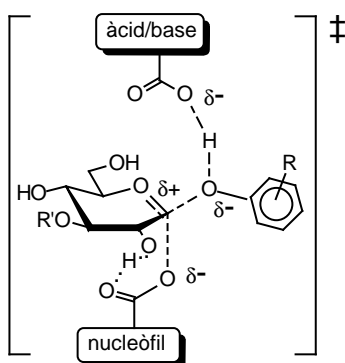


Figura A3.1. Estat de transició de l'etapa de glicosidació.

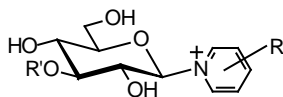


Figura A3.2. Estructura dels ions *N*-glicosilpiridini.

A continuació, la comparació dels pendents de les anàlisis de Hammett amb les dues famílies de substrats permet establir el grau de catàlisi àcida requerida en el cas dels fenols, ja que el canvi de pendent s'atribueix totalment a l'efecte de la catàlisi àcida. Aquesta metodologia s'ha fet servir amb èxit en el cas de la β -glucosidasa A_3 d'*Aspergillus wentii* [2] i en el de la galactosidasa *ebg*⁰ d'*Escherichia coli* [4] (figura A3.3).

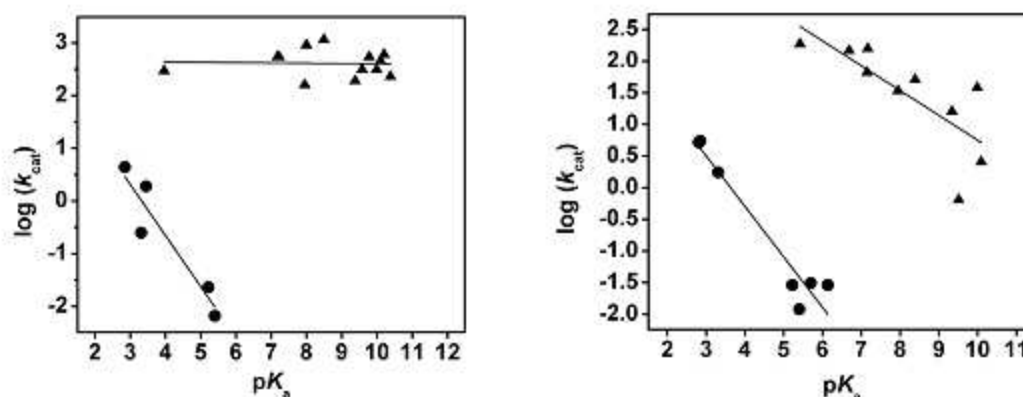


Figura A3.3. Anàlisi de Hammett per a la β -glucosidasa A₃ d'*Aspergillus wentii* (esquerra) i la β -galactosidasa *ebg*⁰ d'*Escherichia coli* (dreta), en què es representa el $\log(k_{\text{cat}})$ enfront del $\text{p}K_{\text{a}}$ de l'aglicona per a dues famílies de substrats: (●) ions *N*- β -D-glicosilpiridini, i (▲) aril *O*- β -D-glicòsids.

En el cas de la β -galactosidasa el pendent del gràfic de Hammett en k_{cat} per a la família d'ions *N*-glicosilpiridini és de -0.8 (en el gràfic en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ el pendent és de -0.9), mentre que per a la família d'aril β -D-galactopiranòsids és de -0.37 (en el gràfic en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ el pendent és de -0.39). Aquests pendents indiquen, d'una banda, que l'escissió d'enllaç C-X està molt avançada, com ho indiquen pendents propers a 1 en el cas dels ions *N*-glicosilpiridini, i que en el cas dels aril β -D-galactopiranòsids es dona aproximadament un terç de protonació en l'estat de transició. En el cas de la β -glucosidasa l'escàs pendent observat amb la família d'aril β -D-glucopiranòsids obliga a assegurar que la glicosidació sigui l'etapa determinant de la velocitat de reacció amb estudis complementaris. Una vegada comprovat que és així per efectes isotòpics d' α -deuteri, la diferència de pendents de -0.96 per a la hidròlisi dels ions d'*N*- β -D-glucopiranosilpiridini i de -0.05 per als aril β -D-glucopiranòsids implica una protonació quasi completa a l'estat de transició per als *O*-glicòsids. Hi ha també altres formes d'establir el grau d'escissió d'enllaç C-O, però impliquen complementar els resultats obtinguts en les anàlisis de Hammett amb altres estudis cinètics.

A3.3. Anàlisis complementàries que ajuden a la interpretació de les anàlisis de Hammett

Les anàlisis de Hammett solen complementar-se amb estudis de cinètiques en estat preestacionari o estudis cinètics d'efectes isotòpics (generalment efectes d' α -deuteri).

En aquest sentit, la informació que es pot obtenir amb les cinètiques en estat preestacionari permet determinar quina és l'etapa determinant de la velocitat de reacció, o bé permet discernir quan un mecanisme de reacció s'allunya del mecanisme bàsic proposat. La determinació dels efectes que produeix sobre la cinètica de reacció la substitució del protó situat en el carboni a C1 per un àtom de deuteri o triti donen informació molt valuosa sobre l'estructura de l'estat de transició que s'estigui estudiant. En aquest cas, ja s'ha de conèixer d'entrada quina és l'etapa determinant de la velocitat de reacció en la hidròlisi del substrat (que es coneix a través d'anàlisi de Hammett, cinètiques en estat preestacionari o efectes isotòpics d'¹⁸O, en què s'ha substituït

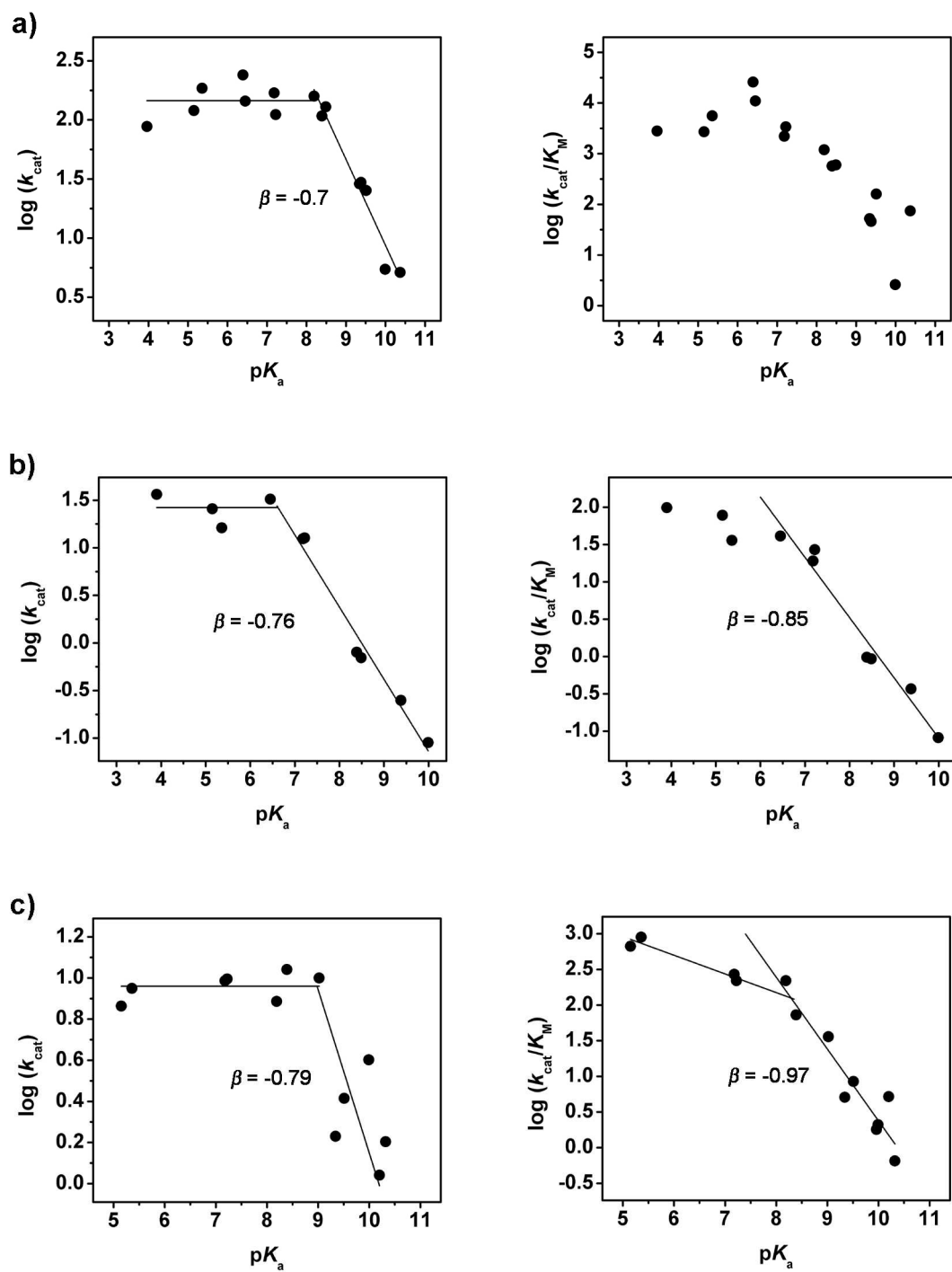
l'oxigen fenòlic pel seu isòtop). Els efectes isotòpics d' α -deuteri estan directament relacionats amb el canvi d'hibridació que té lloc en el carboni anomèric a l'estat de transició. S'ha comprovat que la hidròlisi espontània de glicòsids transcorre a través d'estats de transició amb un marcat caràcter oxocarbocatiònic [5, 6], i en el cas de la catàlisi catalitzada per glicosidases també s'han observat efectes isotòpics de gran magnitud (entre un 10-20%). Aquests valors són indicatius d'un canvi d'hibridació $sp^3 \rightarrow sp^2$ a l'estat de transició, que s'interpreta com un elevat grau de trencament d'enllaç, ja que es relaciona directament el grau de canvi d'hibridació amb el grau de trencament d'enllaç. Per contra, els efectes isotòpics ($k_{\text{substrat}}/k_{\text{substrat deuterat}}$ o k_H/k_D) propers a 1 indiquen que no hi ha canvi d'hibridació en l'etapa determinant de la velocitat de reacció, ja sigui perquè l'etapa determinant de la velocitat de reacció no és una de les etapes catalítiques, o perquè es tracta d'un estat de transició molt inicial amb poc trencament d'enllaç i un elevat grau de preassociació amb el nucleòfil. El resultat dels efectes isotòpics d' α -deuteri en la cinètica d'hidròlisi d'un substrat per al que l'etapa determinant de la velocitat de reacció és l'etapa de glicosidació són complementaris als obtinguts a partir del pendent del gràfic de Hammett, ja que fan referència a l'escissió del mateix enllaç, però des de dos punts de vista diferents. Així, si es disposa dels resultats de tots dos tipus d'experiments es pot arribar a descriure l'estructura de l'estat de transició per a l'etapa de glicosidació. D'una banda, a partir dels resultats de les cinètiques en què es mesuren els efectes isotòpics s'estableix el grau de trencament d'enllaç i el nivell de preassociació amb el nucleòfil (s'estudia el desenvolupament de càrrega sobre el carboni anomèric), mentre que de l'altra, els resultats de les anàlisis de Hammett, una vegada establert el grau d'escissió d'enllaç C-O, permeten determinar el grau de cessió de protó per part de l'àcid general (s'estudia el desenvolupament de càrrega sobre l'oxigen de l'aglicona).

A3.4. Exemples d'anàlisis de Hammett aplicades a glicosidases

A continuació es descriuen un bon nombre de les anàlisis de Hammett aplicades a glicosidases que es poden trobar a la bibliografia i que conformen un mosaic força ampli dels diferents comportaments que s'han observat. En els diferents casos s'exposa la interpretació proposada pels autors i, en aquells casos que s'ha considerat adequat, es discuteix una interpretació alternativa. Generalment les anàlisis de Hammett realitzades amb glicosidases donen correlacions força acceptables entre el logaritme de la velocitat de reacció i el pK_a o la σ del substituent, tot i que hi ha algunes excepcions. Els ajusts realitzats en les diferents figures es corresponen amb els presentats pels autors dels corresponents articles, i en els casos en què no s'ha realitzat cap ajust és per fidelitat amb els articles originals.

A3.4.1. Gràfics de Hammett bifàsics en k_{cat}

A la figura A3.4 es presenten una sèrie d'exemples d'anàlisi de Hammett de diferents glicosidases que presenten un gràfic de Hammett en k_{cat} bifàsic: a) β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* [7], b) β -glucosidasa de *Flavobacterium meningosepticum* [8], c) β -xilosidasa de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* [9], d) β -N-acetilglucosaminidasa de *Vibrio furnisii* [10], i e) β -mannosidasa de *Cellulomonas fimi* [11].



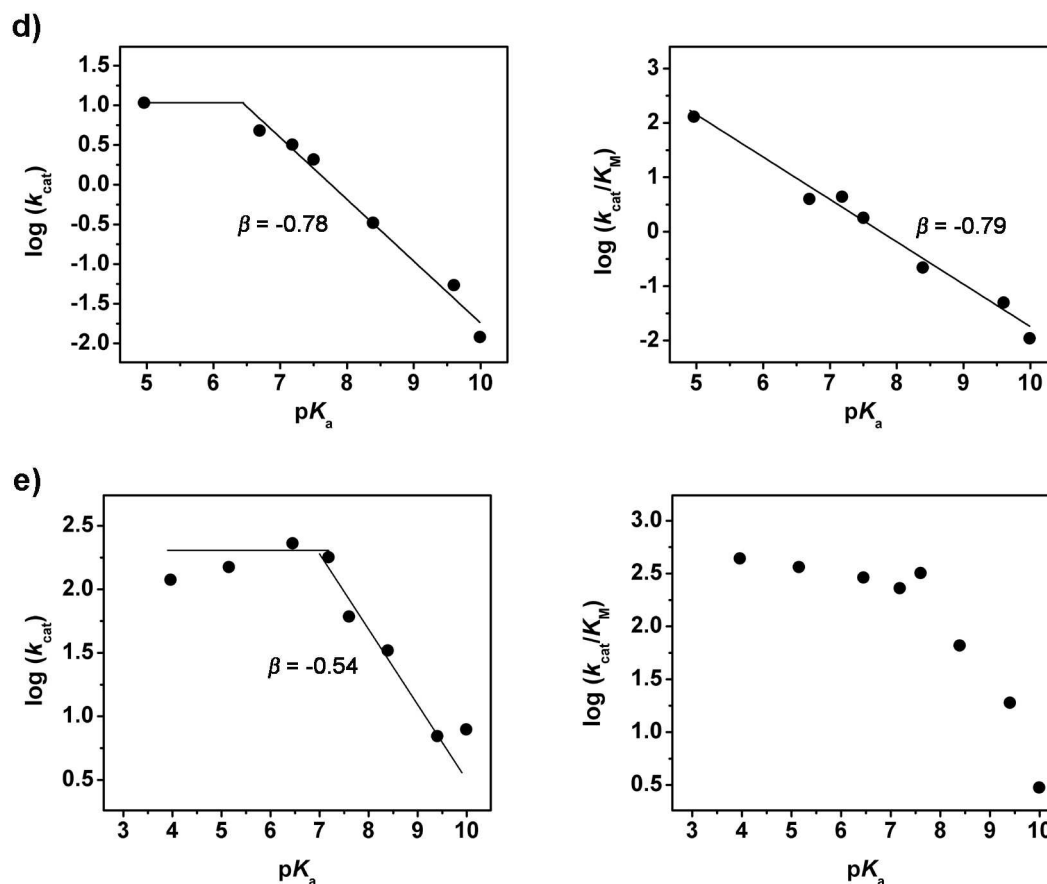


Figura A3.4. Anàlisi de Hammett de les glicosidasas amb diferents famílies d'aril *O*- β -D-glicòsids: a) β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis*; b) β -glucosidasa de *Flavobacterium meningosepticum*; c) β -xilosidasa de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*; d) β -*N*-acetilglucosaminidasa de *Vibrio furnisii*; e) β -mannosidasa de *Cellulomonas fimi*. En els gràfics de l'esquerra es representa el logaritme de la k_{cat} enfront del $\text{p}K_a$ per a cada enzim, mentre que en els gràfics de la dreta es representa el logaritme de la k_{cat}/K_M enfront del $\text{p}K_a$. Els ajusts realitzats en els gràfics són els que indiquen els autors dels corresponents articles.

D'entrada, es pot assegurar que en tots els casos es tracta de glicosidasas que presenten un intermedi de reacció, és a dir, glicosidasas que actuen amb retenció de configuració, cosa que queda reflectida en la dependència en forma de gràfic bifàsic còncau descendent del logaritme de k_{cat} amb el $\text{p}K_a$ de l'aglicona. Aquest fet també queda reflectit en comparar els gràfics de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M , que en representar etapes del mecanisme diferents per a alguns dels substrats, no presenten la mateixa aparença, com s'observa amb claredat en el cas de l'*N*-acetilglucosaminidasa de *Vibrio furnisii* [12].

Analitzant amb més deteniment els gràfics de Hammett en k_{cat} , es poden diferenciar clarament dues zones. Una primera zona que correspon als valors més elevats de $\text{p}K_a$ de les aglicones (que corresponen als pitjors grups sortints) i en què el logaritme de la constant de velocitat mostra una dependència amb el $\text{p}K_a$ de l'aglicona i una segona zona, a $\text{p}K_a$ més baixos (millors grups sortints), en què la velocitat de glicosidació ha augmentat de tal manera que ha deixat de ser l'etapa determinant de la velocitat de reacció. El pendent de la primera zona permet determinar que mentre que a l'estat de transició de l'etapa de glicosidació de la β -xilosidasa de *Thermoanaerobacterium*

saccharolyticum es dona un grau de trencament d'enllaç molt elevat i molt poca protonació, amb un pendent de -0.97 (gràfic c de la figura A3.4), a la β -mannosidasa de *Cellulomonas fimi*, amb un pendent de -0.54 (gràfic e de la figura A3.4), hi ha menys desenvolupament de càrrega a l'oxigen de l'enllaç a escindir, ja sigui per un menor grau d'escissió d'enllaç o per una major aportació de catalisi àcida. Per a les altres β -glicosidases, amb pendents entre -0.7 i -0.8, es conclou que hi ha un elevat grau de desenvolupament de càrrega a l'estat de transició per a l'etapa de glicosidació. A continuació, en el gràfic de Hammett es passa per un punt d'inflexió, que a cada glicosidasa es dona a un pK_a diferent, i finalment s'arriba a una etapa en què el logaritme de la constant de velocitat deixa de ser dependent del pK_a de l'aglicona. Aquesta manca de dependència pot ser deguda al fet que la desglicosidació passi a ser determinant de la velocitat de reacció, o be que ho sigui una etapa no-química, com pot ser un canvi conformacional o una etapa de dissociació de producte. La millor manera de diferenciar entre aquestes dues possibilitats és verificar que la desglicosidació passa a ser determinant de la velocitat de reacció ja sigui per l'obtenció de valors elevats en mesures d'efectes isotòpics cinètics d' α -deuteri; o per estudis de competència amb nucleòfils externs, en què, si la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció, s'han d'obtenir valors de velocitat creixents amb la concentració del nucleòfil. Per a quatre dels enzims de la figura A3.4 es comprova que la desglicosidació és l'etapa determinant, en els casos de la β -xilosidasa i la β -mannosidasa mitjançant estudis de partició amb nucleòfils externs, i per a les dues β -glucosidases amb estudis d'efectes isotòpics. Amb la β -N-acetilglucosaminidasa la proposta que la desglicosidació passi a ser determinant de la velocitat de reacció per al substrat més activat es basa en el baix valor de la K_M per a aquest substrat. El fet que en els gràfics de Hammett en k_{cat} el canvi entre les dues fases sigui tan brusc també advoca a favor d'un canvi d'etapa catalítica com a etapa determinant de la velocitat de reacció [2].

Pel que fa als gràfics de Hammett en k_{cat}/K_M , el fet que el pendent obtingut amb els substrats menys reactius sigui molt similar al pendent per al gràfic de Hammett en k_{cat} evidencia que, per a aquests substrats, l'etapa determinant de la velocitat de reacció és la glicosidació. D'altra banda, si bé la interpretació d'aquests tipus de gràfics de Hammett bifàsics en k_{cat} resulta relativament senzilla, no passa el mateix amb els gràfics de Hammett en k_{cat}/K_M , en què l'explicació de la pèrdua de linealitat no és tan evident. L'explicació que sembla més senzilla és la proposada en el cas de la β -glucosidasa d'ametlla dolça [13], en què es planteja que a mesura que augmenta la velocitat de l'etapa de glicosidació, l'etapa determinant de la velocitat de reacció passa a ser l'etapa de formació del complex de Michaelis. La definició del paràmetre k_{cat}/K_M per a un mecanisme general de retenció de configuració és la següent:

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1} + k_2} \quad \text{Equació A3.3.}$$

on les constants de velocitats k_1 i k_{-1} corresponen a l'etapa de formació del complex de Michaelis i la k_2 és la constant de velocitat de l'etapa de glicosidació. En el moment en què $k_2 \gg k_{-1}$, la constant $k_{cat}/K_M \approx k_1$. Aquesta explicació va ser ràpidament acceptada i aplicada a altres glicosidases, com la β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* [7]. Ara bé, aquesta explicació només és vàlida en el cas que la velocitat de l'etapa de glicosidació assoleixi velocitats de l'ordre de la velocitat de límit difusional ($10^8 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). Això va fer que aquesta explicació, que s'havia generalitzat en un principi, deixés de ser aplicable a moltes glicosidases, i que es qüestionés la seva veracitat també en el cas

de la β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* (amb valors de k_{cat}/K_M de fins a $10^7 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$), ja que el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M per al mutant Tyr298Phe de la β -glucosidasa, presenta també la mateixa aparença bifàsica, però amb valors de k_{cat}/K_M que no superen els $10^4 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ [14].

En el cas de la β -xilosidasa de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* i de la β -mannosidasa de *Cellulomonas fimi*, en què la velocitat de reacció està molt per sota del límit difusional es proposa un mecanisme alternatiu, que inclou una etapa d'alliberament de l'aglicona que es va fent més lenta com més àcida és aquesta. Per tal de desenvolupar la seva hipòtesi, prenen com exemple la β -glucosidasa d'ametlla dolça, en què s'ha postulat que les aglicones en forma d'anió fenolat tenen un comportament "enganxós" al centre actiu de l'enzim, i són millors inhibidors com més àcides són per l'establiment d'un pont d'hidrogen fort amb el residu que actua d'àcid general [15].

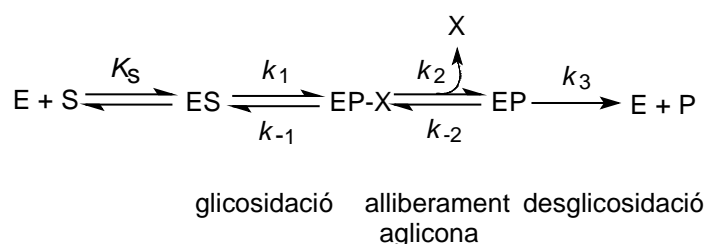


Figura A3.5. Mecanisme proposat per a la β -mannosidasa de *Cellulomonas fimi* per tal d'explicar el gràfic de Hammett bifàsic en k_{cat}/K_M .

El fet d'introduir una etapa lenta a continuació de l'etapa de glicosidació els permet proposar la reversibilitat d'aquesta etapa per als substrats més reactius, de manera que com el paràmetre k_{cat}/K_M aporta informació de la reacció fins a la primera etapa irreversible, s'amplia el nombre d'etapes que poden tenir influència en el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M . Això porta al plantejament del mecanisme que es mostra a la figura A3.5 per a la β -mannosidasa de *Cellulomonas fimi* [11], en què l'etapa de glicosidació passa de ser reversible per als substrats més reactius a irreversible per als menys reactius. En el cas de la β -xilosidasa de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* es planteja un mecanisme similar, però no s'arriba a abordar la qüestió de si l'etapa d'alliberament d'aglicona es considera reversible. En qualsevol dels casos, aquest plantejament presenta una sèrie de punts febles que val la pena comentar:

D'entrada, és discutible que pel fet d'introduir una etapa lenta després de l'etapa de glicosidació, aquesta es transformi en una etapa catalítica reversible, més enllà del pur formalisme. Per tal que això fos possible i sobretot cinèticament significatiu, la constant de velocitat de la reacció reversa a la glicosidació hauria de tenir una magnitud no menyspreable respecte de la velocitat d'hidròlisi de l'enllaç glicosídic, i en base a l'excel·lència d'aquests enzims com a catalitzadors, aquesta assumpció sembla exagerada. A més, se suposa que aquest canvi es dona de forma brusca dins d'una família de substrats que només difereixen en l'estructura electrònica de la seva aglicona (família de fenols substituïts amb grups acceptors de càrrega), i que la reacció reversa (que és un atac nucleofílic sobre el complex glicosil-enzim) passa a ser important precisament per a les aglicones menys nucleòfiles de la sèrie.

Una altra qüestió a considerar, és que el mecanisme al què es recorre per tal d'interpretar l'anàlisi de Hammett en k_{cat}/K_M també ha de ser capaç d'explicar l'anàlisi de Hammett en k_{cat} . Tant per a la β -xilosidasa de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* com per a la β -mannosidasa de *Cellulomonas fimi* s'ha comprovat que l'etapa determinant de la velocitat de reacció per als substrats més reactius és l'etapa de desglicosidació. De manera que, considerant una etapa d'alliberament d'aglicona reversible, els dos gràfics de Hammett haurien de ser iguals, perquè estarien donant informació sobre les mateixes etapes catalítiques: la glicosidació en el cas dels substrats menys reactius i la desglicosidació per a la resta (mecanismes superiors de la figura A3.6). En el cas de la β -mannosidasa podria arribar a acceptar-se que els dos gràfics són molt semblants, però en el cas de la β -xilosidasa el pendent del gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M per als substrats més reactius és clarament diferent de 0. L'única combinació que podria explicar els resultats en el cas de la β -xilosidasa és que es consideri que l'etapa d'alliberament de l'aglicona sigui una etapa irreversible (mecanismes inferiors de la figura A3.6), de manera que mentre que al gràfic de Hammett en k_{cat} quedin reflectides les etapes de glicosidació i desglicosidació en el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M quedin reflectides les etapes de glicosidació i la d'alliberament de l'aglicona. Ara bé, s'ha de tenir present que aquesta opció considera com irreversible una etapa no-química, de dissociació d'un producte de reacció, i com a reversible, una etapa de transformació química; justament al contrari del que està generalment acceptat en enzimologia.

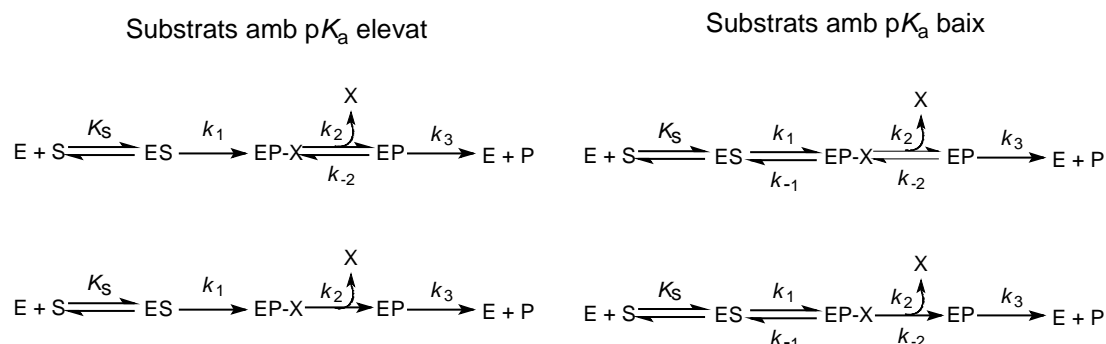
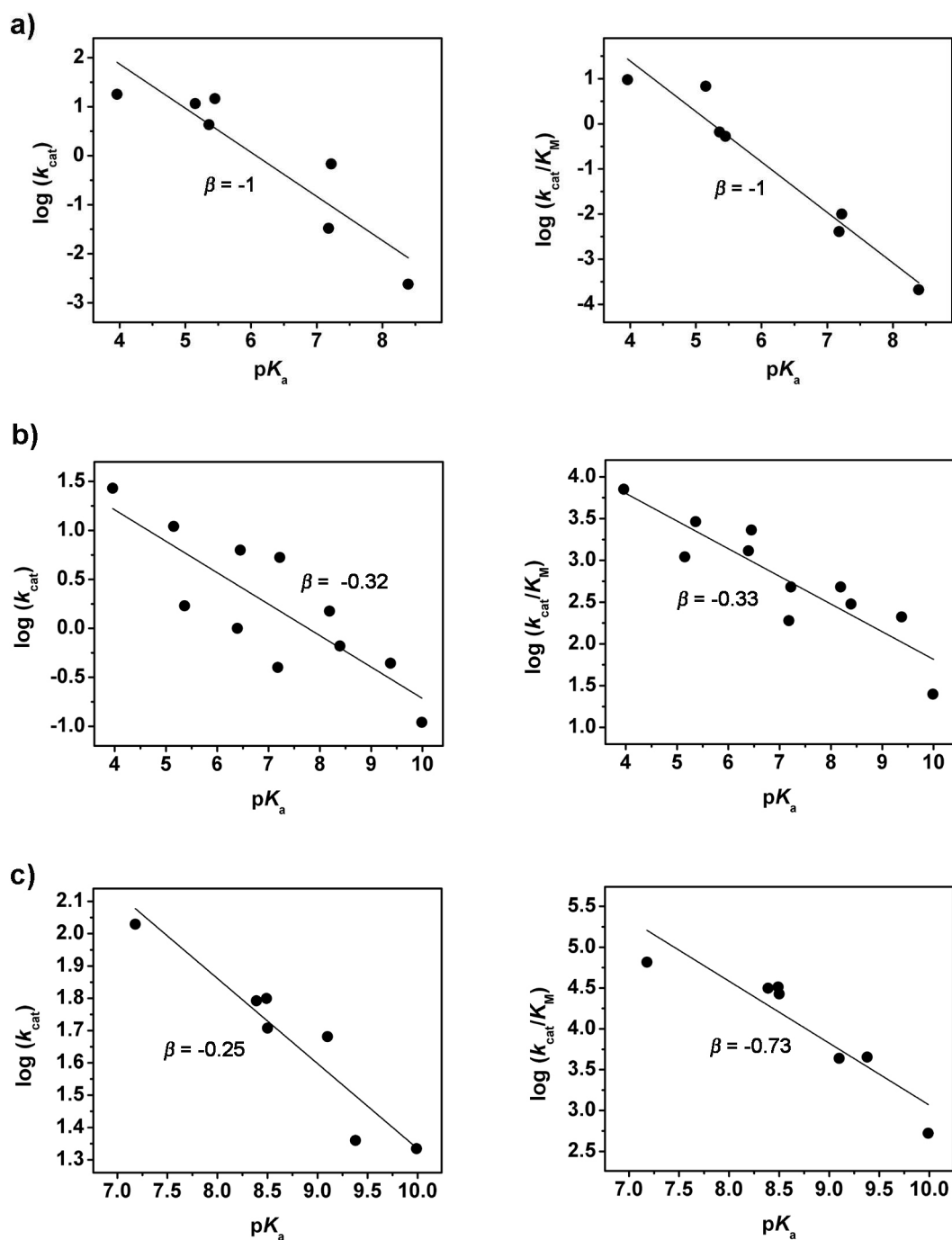


Figura A3.6. Possibles mecanismes per a una glicosidasa que actua amb retenció de configuració, afegint una etapa lenta d'alliberament d'aglicona. Es proposen quatre possibilitats en funció de si les etapes de glicosidació i d'alliberament d'aglicona són reversibles o irreversibles.

Veient que la proposta dels autors per tal d'explicar els resultats de les anàlisis de Hammett de la β -xilosidasa de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* i la β -mannosidasa de *Cellulomonas fimi* és, en el millor dels casos, molt qüestionable, s'estudia una altra possibilitat. El fet que els gràfics de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M siguin diferents només pot explicar-se en base a una etapa que està reflectida en el terme k_{cat}/K_M i no en el terme k_{cat} , i aquesta etapa pot estar perfectament relacionada amb la formació del complex de Michaelis. Si bé la difusió del substrat dins del centre actiu no pot passar a ser determinant de la velocitat de reacció per una qüestió de magnituds relatives, com comenten els autors dels articles, sí es pot donar un canvi conformacional posterior a la unió, ja sigui de l'enzim, del substrat, o del complex enzim substrat, que faci alentir la velocitat de formació del complex de Michaelis, i passi a ser determinant de la velocitat de reacció per als substrats més activats. Aquesta etapa en ser anterior a l'etapa de glicosidació no quedaria reflectida en el gràfic de Hammett en k_{cat} , i per contra podria marcar la diferència entre els dos gràfics de Hammett.

A3.4.2. Gràfics de Hammett monofàsics en k_{cat}

A la figura A3.7 es presenten una sèrie d'exemples d'anàlisis de Hammett de diferents glicosidasas que actuen amb retenció de configuració i presenten un gràfic de Hammett en k_{cat} monofàsic: a) exoglucanasa/xilanasa de *Cellulomonas fimi* (Cex) [16], b) α -1,4-glucanasiase de *Gracilariopsis* [17], c) neuraminidasa de *Vibrio cholerae* [18], d) β -xilosidasa de *Trichoderma koningii* G-39 [19], e) neuraminidasa del virus de la grip A [20], i f) neuraminidasa de *Salmonella typhimurium* [12]. En aquests gràfics es donen nivells de correlació entre els paràmetres força diferents i es pot observar gran diversitat de comportaments.



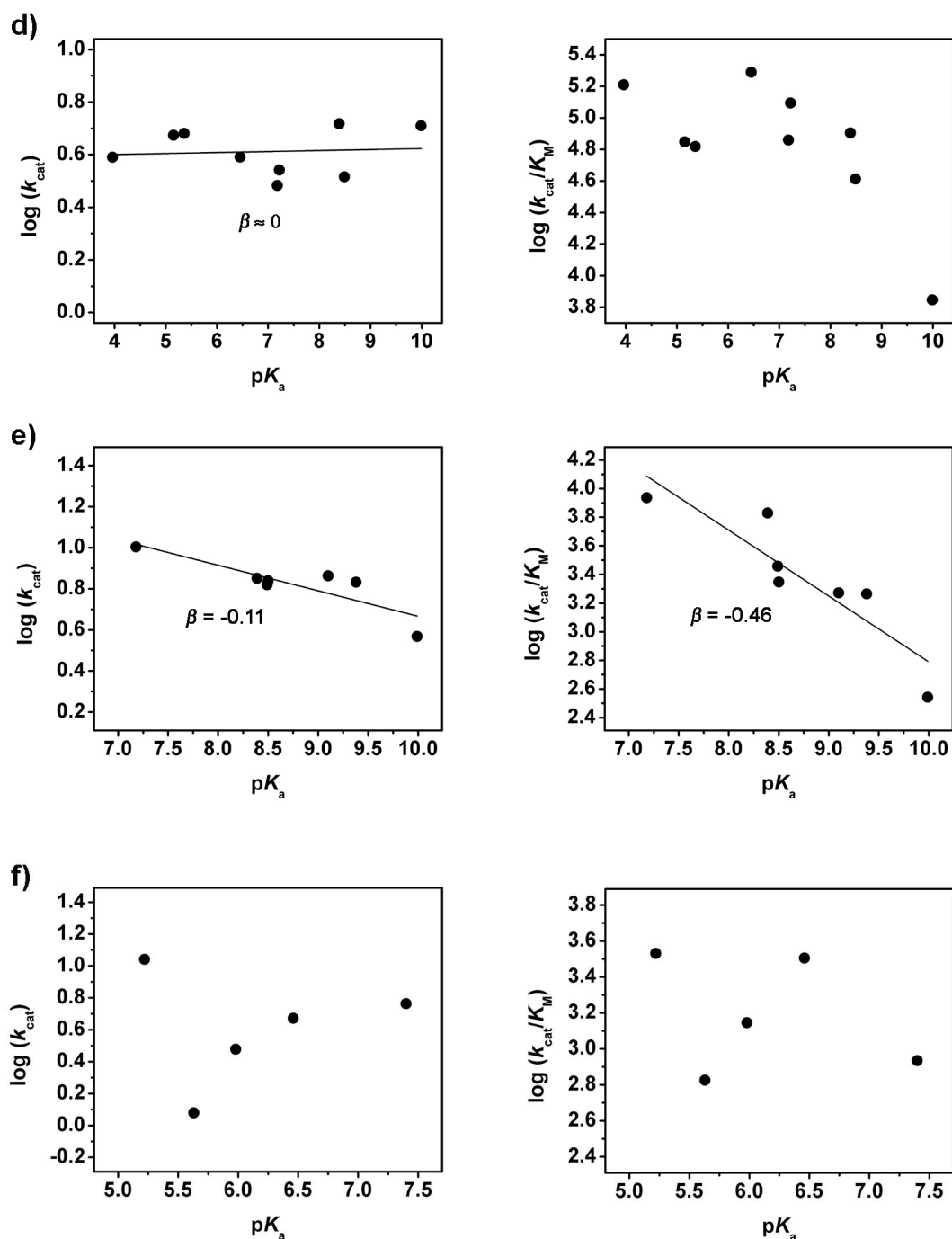


Figura A3.7. Anàlisi de Hammett de diverses glicosidases amb diferents famílies d'aril O - β -D-glicòsids a excepció del cas de la neuraminidasa de *Salmonella typhimurium* en què les anàlisis de Hammett es realitzen amb una família d'ions N -(α -D- N -acetilneuraminil)piridini i de l' α -1,4-glucanasi que hidrolitza aril α -D-glicòsids: a) exoglucanasa/xilanasa de *Cellulomonas fimi* (Cex); b) α -1,4-glucanasi de *Gracilariopsis*; c) neuraminidasa de *Vibrio cholerae*; d) β -xilosidasa de *Trichoderma koningii* G-39; e) neuraminidasa del virus de la grip A; f) neuraminidasa de *Salmonella typhimurium*. En els gràfics de l'esquerra es representa el logaritme de la k_{cat} enfront del $\text{p}K_{\text{a}}$ de l'aglicona per a cada enzim, mentre que en els gràfics de la dreta es representa el logaritme de la $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ enfront del mateix $\text{p}K_{\text{a}}$. Els ajusts realitzats en els gràfics són els que indiquen els autors dels corresponents articles, en els casos en què no s'ha realitzat cap ajust és per fidelitat amb els articles originals.

En els tres primers exemples, l'exoglucanasa/xilanasa de *Cellulomonas fimi* (Cex), l' α -1,4-glucanliasa de *Gracilariopsis* i la neuraminidasa de *Vibrio cholerae*, s'observen gràfics de Hammett en què tant el logaritme de la k_{cat} com el de la $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ mostren una dependència amb el $\text{p}K_{\text{a}}$ de l'aglicona del substrat. En el cas de la Cex i de l' α -1,4-glucanliasa el pendent del gràfic en k_{cat} i en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ és el mateix, de -1 per a l'exoglucanasa i de -0.3 per a l' α -1,4-glucanliasa, indicatiu que els dos paràmetres fan referència al mateix procés, que és l'etapa de glicosidació. La diferència en el valor del pendent indica que mentre a l'exoglucanasa l'estat de transició d'aquesta etapa presenta un grau d'escissió d'enllaç molt elevat i poca protonació per part del residu que actua com a àcid general, en el cas de l' α -1,4-glucanliasa, en què es comprova amb efectes isotòpics d' α -deuteri que a l'estat de transició també es dona una escissió d'enllaç elevat, el baix valor del pendent obtingut és indicatiu de l'elevat grau de catàlisi àcida.

El cas de la neuraminidasa de *Vibrio cholerae* és una mica diferent, ja que el pendent del gràfic de Hammett en k_{cat} i en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ és diferent (gràfics **c** de la figura A3.7). Mentre que el pendent del gràfic en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ és de -0.73, el pendent en k_{cat} és de -0.25, amb una bona correlació dels resultats en els dos casos. El fet que el pendent en el gràfic en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$, que amb tota probabilitat reflecteix l'etapa de glicosidació, sigui de -0.73 indica que hi ha un considerable desenvolupament de càrrega en l'estat de transició en aquesta etapa. Per tal d'explicar la diferència de pendent observada en el gràfic de Hammett en k_{cat} es podria pensar en què l'etapa de glicosidació no és totalment determinant de la velocitat de la reacció, i que la desglicosidació o altres etapes no-covalents (canvis conformacionals o etapes d'alliberament de producte) siguin parcialment determinants de la velocitat de reacció. Ara bé, una sèrie d'experiments d'efectes isotòpics sobre k_{cat} i $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ descarten la hipòtesi anterior i ratifiquen que l'etapa de glicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció tant en k_{cat} com en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$, i que hi ha un elevat grau d'escissió d'enllaç. Així doncs, els autors atribueixen aquesta disminució en el pendent del gràfic de Hammett en k_{cat} a una possible interacció entre el sistema π de l'aglicona i algun grup aniònic de l'enzim. La pregunta al respecte és: per què aquesta mateixa interacció no es veu en el gràfic de Hammett en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$, si en els dos casos s'està fent referència a la mateixa etapa de reacció?

El gràfic de Hammett en k_{cat} per a la β -xilosidasa de *Trichoderma koningii* G-39 és un exemple clar de manca de dependència entre el logaritme de la constant cinètica de primer ordre i el $\text{p}K_{\text{a}}$ de l'aglicona (gràfics **d** de la figura A3.7). Aquesta manca de dependència en un gràfic monofàsic pot indicar que l'etapa de glicosidació és determinant de la velocitat de reacció, però amb un nivell de protonació per part de l'àcid general pràcticament total, de manera que compensa la densitat de càrrega negativa que es desenvolupa a l'oxigen fenòlic; que la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció; o alternativament, que la velocitat de reacció es regeix per una etapa no-covalent. En aquest cas es pot descartar el fet que la glicosidació sigui l'etapa determinant de la velocitat de reacció ja que en el gràfic de Hammett en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$, encara que d'una forma bastant dispersa, s'observa una dependència de la constant cinètica de segon ordre amb el $\text{p}K_{\text{a}}$ de l'aglicona. En aquest cas, a través d'experiments de competència amb nucleòfils externs s'arriba a la conclusió que l'etapa determinant de la velocitat de reacció és la desglicosidació. Un altre cas similar a aquest és el de l'*N*-acetilglucosaminidasa de *Streptomyces plicatus*, amb un gràfic de Hammett en k_{cat} bàsicament pla, i un gràfic en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ amb un pendent de -0.29 [10] o el de la β -xilosidasa d'*Aspergillus awamori*, per a la que tant el gràfic de

Hammett en k_{cat} com en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ són plans [21]. En el primer cas, es determina que la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció a través d'estudis d'efectes isotòpics, i en el segon per competència amb nucleòfils externs.

Ara bé, no s'ha de pensar que la majoria dels casos en què no s'observa dependència entre el logaritme del paràmetre k_{cat} i el $\text{p}K_{\text{a}}$ de l'aglicona són indicatius d'una desglicosidació limitant de la velocitat de reacció. Per exemple, l'activitat sacarasa i l'activitat isomaltasa de la sacarasa-isomaltasa de l'intestí prim de conill [22], presenten valors de pendents molt baixos per als gràfics de Hammett tant en k_{cat} com en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$, del mateix ordre de magnitud dels obtinguts en la catàlisi àcida específica d' α - i β -glucòsids [23, 24]. El cas de l' α -L-arabinofuranosidasa de *Monilinia fructigena* amb pendents de -0.11 per al gràfic de Hammett en k_{cat} i de -0.16 en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ és similar [25]. A través d'efectes isotòpics s'ha comprovat que per a les tres activitats enzimàtiques esmentades, l'etapa determinant de la velocitat de reacció és l'escissió de l'enllaç C-O del glicòsid i que l'estat de transició té un elevat caràcter oxocarbocatiònic. El conjunt dels resultats només deixa com a possible l'opció que tant els gràfics de Hammett en k_{cat} com en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ estiguin reflectint l'etapa de glicosidació, i que en aquesta, la protonació de l'oxigen glicosídic sigui pràcticament total a l'estat de transició.

A l'apartat e de la figura A3.7 es mostren les anàlisis de Hammett per a la neuraminidasa del virus de la grip A. Els pendents dels gràfics en k_{cat} i $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ són de -0.11 i -0.46, respectivament. A l'igual del que passa amb la neuraminidasa de *Vibrio cholerae* els pendents dels dos gràfics no coincideixen, tot i que en aquest cas el fet que el pendent del gràfic en k_{cat} sigui tan baix i la correlació dels resultats no sigui tan bona posa en dubte que la glicosidació sigui l'etapa determinant de la velocitat de reacció en k_{cat} . S'observen efectes isotòpics d' ^{18}O en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$, però no en k_{cat} , cosa que indica que l'etapa determinant de la velocitat de reacció en $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ és l'etapa de glicosidació, com a mínim parcialment, però que aquesta no és l'etapa que se segueix en k_{cat} . El conjunt de resultats obtinguts a partir de diferents experiments d'efectes isotòpics porten a postular que, en aquest cas, l'etapa determinant de la velocitat de reacció és un canvi conformacional posterior a l'escissió de l'enllaç glicosídic. De fet els autors proposen que el canvi conformacional del que parlen és el canvi basat en la reversibilitat microscòpica que s'ha de donar en una glicosidasa que actua amb retenció de configuració. Així proposen que després de l'etapa de glicosidació es dona un canvi conformacional invers al canvi que es dona en formar el complex de Michaelis en el que es passa de la conformació del sucre en estat fonamental, de 2C_5 , a la conformació $B_{2,5}$ observada per al complex enzim-substrat [26]. Tots aquests resultats porten al plantejament d'un mecanisme enzimàtic en què els canvis conformacionals de diferents complexos enzim-lligand prenen un paper determinant en la velocitat de la reacció.

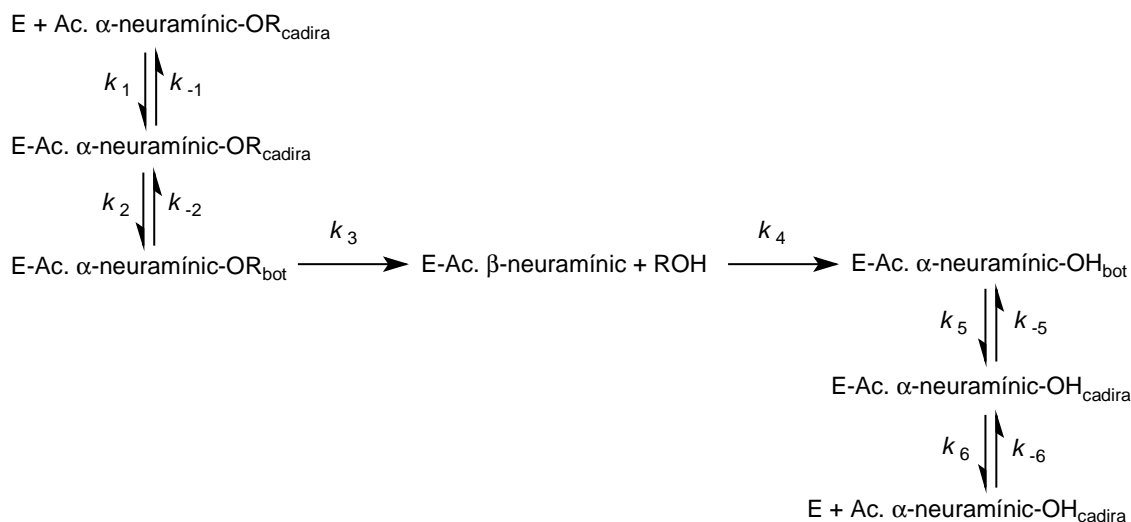


Figura A3.8. Mecanisme proposat per a l'activitat hidrolítica de la neuraminidasa del virus de la grip A. Es postula que les etapes de canvi conformacional, com a mínim la descrita per les constants cinètiques k_5 i k_{-5} , és significativa a nivell cinètic.

El mecanisme global, esquematitzat a la figura A3.8, implica que a continuació de la unió enzim-substrat es dona un canvi conformacional del complex, que l'apropa més a l'estructura de l'estat de transició; a continuació es donen les dues etapes catalítiques, que van seguides per un canvi conformacional del complex enzim-producte abans de l'alliberament del segon producte de la reacció. És aquest segon canvi conformacional el que els autors proposen que sigui el determinant de la velocitat de reacció en k_{cat} .

Les anàlisis de Hammett realitzades sobre el mateix enzim amb una família d'ions *N*-(α -D-*N*-acetilneuraminil)piridini descriuen uns pendents en k_{cat} i k_{cat}/K_M de 0.17 i 0, respectivament [27]. Donat que amb aquests compostos no es dona la catàlisi àcida i que els valors de k_{cat}/K_M són de l'ordre de $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, es poden descartar tant una glicosidació limitant de la velocitat de reacció com una etapa d'unió enzim-substrat limitant en k_{cat}/K_M . De fet el mecanisme proposat a partir de la hidròlisi dels aril *N*- α -acetilneuramínids encaixa a la perfecció amb un canvi conformacional previ a l'etapa de glicosidació, que és el que defineix la velocitat en el terme k_{cat}/K_M , i un altre després de l'etapa de desglicosidació que determina la velocitat en k_{cat} . També entra dins del que és d'esperar que amb aquests compostos les etapes de canvi conformacional prenguin un paper més rellevant, ja que la seva llibertat rotacional és inferior a la dels aril anàlegs (figura A3. 9).

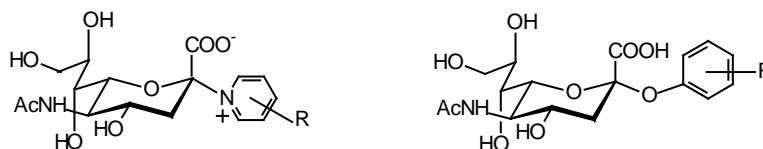


Figura A3.9. Estructura de les dues famílies de substrats amb les que s'han realitzat les anàlisis de Hammett de la neuraminidasa del virus de la grip A esmentades en el text: ions *N*-(α -D-*N*-acetilneuraminil)piridini (esquerra) i aril α -D-*N*-acetilneuramínids (dreta).

Fent servir també una família d'ions *N*-(α -D-*N*-acetilneuraminil)piridini es realitzen anàlisis de Hammett amb una sèrie de neuraminidases. Un exemple és la neuraminidasa de *Salmonella typhimurium* que es presenta com subapartat **f** a la figura A3.7 o el de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* [12]. Per a cap dels dos enzims els pendents dels gràfics de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M són gaire importants. Basant-se en el fet que els pendents dels gràfics en k_{cat} i en k_{cat}/K_M siguin tan similars els autors proposen que els dos paràmetres estan reflectint la mateixa etapa. Com treballant amb ions *N*-(α -D-*N*-acetilneuraminil)piridini aquesta etapa no pot ser la glicosidació, ja que no es dona la catàlisi àcida, proposen que, per als dos enzims, l'etapa determinant de la velocitat de reacció deu ser un canvi conformacional anterior a l'etapa de glicosidació. Generalment s'assumeix que els canvis conformacionals són reversibles, de manera que a les conclusions dels autors s'hauria d'afegir que molt possiblement es donen dos canvis conformacionals diferents, un anterior a l'etapa de glicosidació, que és el que es veuria reflectit en el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M , i un altre en algun moment posterior a aquesta etapa, que seria el que s'observaria en el gràfic de Hammett en k_{cat} . Només amb un canvi conformacional reversible anterior a l'etapa de glicosidació no es pot explicar el gràfic de Hammett en k_{cat} .

A3.4.3. Anàlisis de Hammett amb resultats no convencionals

Entre les anàlisis de Hammett que se surten dels exemples anteriors i donen gràfics de Hammett d'interpretació més difícil o menys convencional es troba el cas de la β -galactosidasa *lacZ* d'*Escherichia coli*. Aquest enzim presenta cinètiques monofàsiques de pendents elevats en la hidròlisi de sals d'*N*- β -D-galactopiranosil piridini [28], i d'una família de diferents alquil β -D-galactopiranosids [29] (figura A3.10). Ara bé, quan les cinètiques s'han realitzat amb una família d'aril β -D-galactopiranosids, el gràfic de Hammett en k_{cat} presenta un aspecte complicat sense una dependència clara amb l'acidesa del grup sortint [30] (figura A3.11).

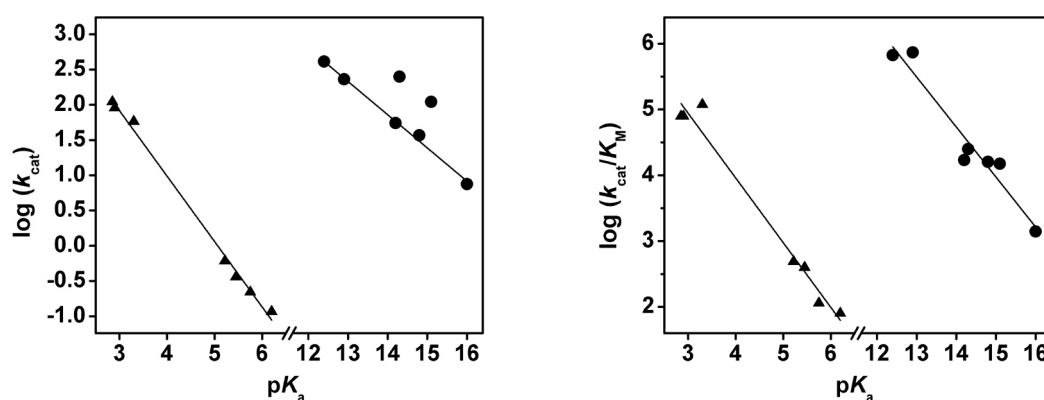


Figura A3.10. Anàlisis de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M de la β -galactosidasa *lacZ* d'*Escherichia coli*, amb dues famílies de substrats diferents. En els gràfics es representa el logaritme de la constant k_{cat} enfront del $\text{p}K_a$ de l'aglicona (esquerra) i el logaritme de la constant k_{cat}/K_M enfront del $\text{p}K_a$ de l'aglicona (dreta) amb dues famílies de substrats diferents: (▲) ions *N*- β -D-galactopiranosil piridini, i diferents alquil β -D-galactopiranosids (●).

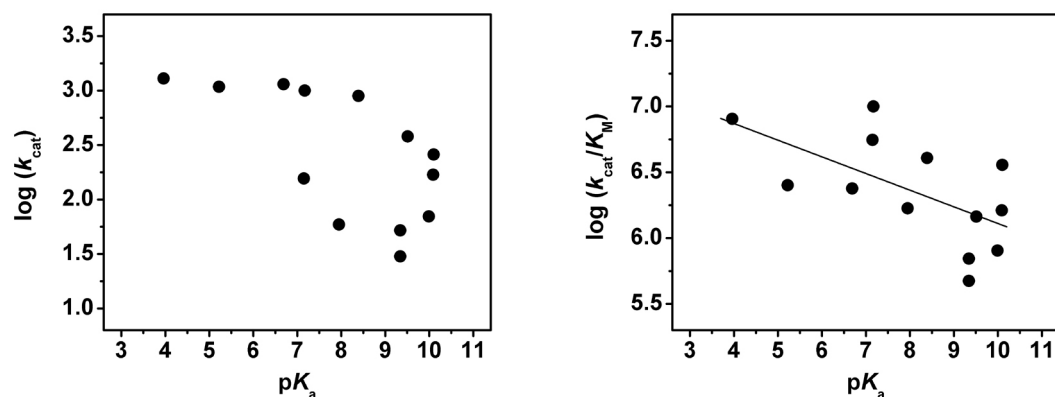


Figura A3.11. Anàlisi de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M de la β -galactosidasa *lacZ* d'*Escherichia coli*, amb una família d'aril β -D-galactopiranosíds. En els gràfics es representa el logaritme de la constant k_{cat} enfront del pK_a de l'aglicona (esquerra) i el logaritme de la constant k_{cat}/K_M enfront del pK_a de l'aglicona (dreta).

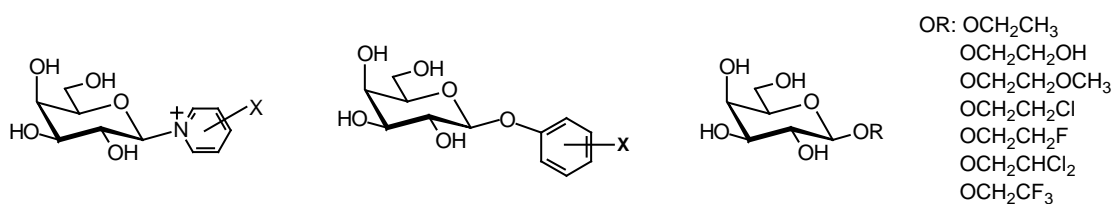


Figura A3.12. Estructura de les tres famílies de substrats amb les que s'han realitzat les anàlisis de Hammett de la β -galactosidasa *lacZ* d'*Escherichia coli* esmentades en el text: sals d'*N*- β -D-galactopiranosil piridini (esquerra), d'aril β -D-galactopiranosíds (centre) i d'alquil β -D-galactopiranosíds (dreta).

L'anàlisi de Hammett complex en el cas dels aril β -D-galactopiranosíds es complementa amb una sèrie de resultats d'efectes isotòpics d' α -deuteri que varien dins del marge de 1.00 per als substrats menys reactius fins a 1.25 per a la hidròlisi de l'intermedi covalent. Aquests resultats d'efectes isotòpics no són aplicables al mecanisme bàsic de retenció de configuració en dues etapes, en què com a màxim s'esperarien dos valors d'efectes isotòpics (un per a cada etapa, en el cas d'observar-se un canvi d'etapa determinant de la velocitat de reacció) que a més, en base al principi de reversibilitat microscòpica, no serien especialment diferents. Així doncs, proposen un mecanisme que inclou una etapa de canvi conformacional posterior a l'etapa d'unió, que seria l'etapa determinant de la velocitat de reacció per als substrats menys reactius, i que quadraria amb valors d'efectes isotòpics d' α -deuteri propers a la unitat. D'altra banda, un canvi conformacional com el proposat podria explicar que la correlació entre els resultats en el gràfic de Hammett sigui tan dolenta, ja que amb un canvi conformacional jugant un paper significatiu en la velocitat de reacció els efectes electrònics, per ells mateixos, no podrien explicar els resultats. Els autors proposen que el canvi conformacional serveixi per orientar correctament els residus catalítics per tal facilitar la hidròlisi, i que en el cas de les altres famílies de substrats, en què les anàlisis de Hammett són monofàsiques, o

bé no es dóna el canvi conformacional perquè els residus catalítics ja es troben orientats de forma adequada, o bé el canvi conformacional és molt més ràpid que l'etapa de glicosidació. Tot i que no s'esmenta de forma explícita, en aquesta explicació s'assumeix que els diferents aril β -D-galactopiranosids no s'uneixen de la mateixa manera al centre actiu de l'enzim, ja que la correcta orientació dels residus catalítics envers el substrat només sembla ser una etapa lenta en el cas dels substrats menys reactius, i per als substrats més reactius deixa de tenir un paper cinèticament significatiu. D'altra banda, aquesta explicació només és aplicable per al gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M , ja que l'etapa de canvi conformacional suggerida no afectaria la k_{cat} , a no ser que s'accepti que es dóna un canvi conformacional similar posterior a l'etapa de glicosidació.

Amb les α -glucosidases de llevat de cervesa (*Saccharomyces cerevisiae*) [31] i de flequer (*Saccharomyces italicus*) [3] tampoc s'obtenen bones correlacions entre els resultats en les anàlisis de Hammett. En el primer cas només s'esmenta que els grups electronegatius podrien afavorir lleugerament la hidròlisi, però la dispersió dels resultats és massa important per tal d'anar més lluny en la seva interpretació (figura A3.13).

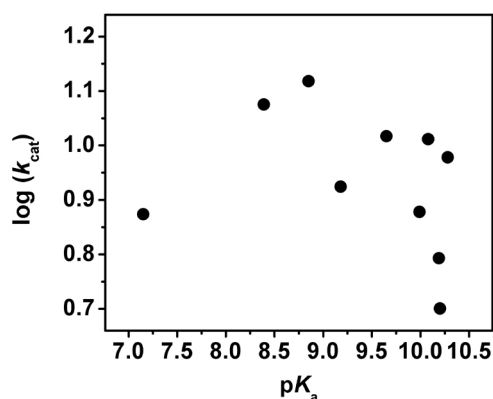


Figura A3.13. Anàlisi de Hammett en k_{cat} de l' α -glucosidasa de llevat de cervesa. En el gràfic es representa el logaritme de la constant k_{cat} enfront del pK_a de l'aglicona.

Per a l'enzim de llevat de flequer es realitzen cinètiques tant amb aril α -D-glucopiranosids com amb sals d'*N*- α -D-glucopiranosilpiridini (figura A3.14). En el cas d'aquesta darrera família de substrats, el gràfic de Hammett en k_{cat} amb un pendent de -0.61 indica que l'etapa determinant de la velocitat de reacció per a aquests substrats és l'escissió de l'enllaç C-O. Ara bé, tant els gràfics de Hammett en k_{cat}/K_M per a les dues famílies de substrats com el gràfic de Hammett en k_{cat} per als aril α -D-glucopiranosids indiquen que, en aquests casos, l'etapa determinant de la velocitat de reacció és una etapa no-covalent. Aquests resultats es complementen amb cinètiques en què s'avaluen els efectes isotòpics d' ^{18}O , i α - i β -deuteri tant en k_{cat} com en k_{cat}/K_M , que porten a la conclusió que l'etapa determinant en la hidròlisi dels aril α -D-glucopiranosids és un canvi conformacional posterior a la unió enzim-substrat, que té com a resultat que l'anell de piranosa passi d'una conformació de cadira a l'estat fonamental a adoptar la conformació de $^{2,5}B$ a l'estat de transició.

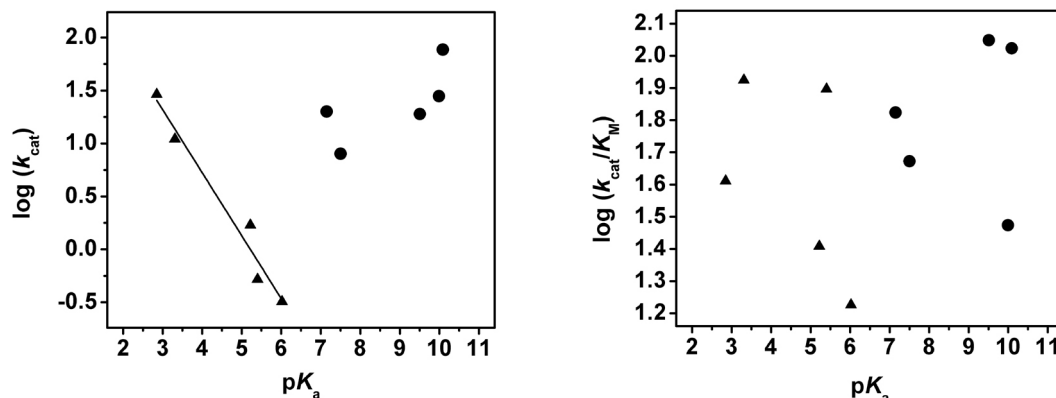


Figura A3.14. Anàlisi de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M de l' α -glucosidasa de llevat de flequer amb una família d'aril α -D-glucopiranosids (●) i una altra de sals d' N - α -D-glucopiranosilpiridini (▲). En els gràfics es representa el logaritme de la constant k_{cat} enfront del pK_a de l'aglicona (esquerra) i el logaritme de la constant k_{cat}/K_M enfront del pK_a de l'aglicona (dreta).

El fet que la conformació adoptada per l'anell de piranosa en les sals d' N - α -D-glucopiranosilpiridini a l'estat fonamental sigui de tipus cadira distorsionada, segurament 1S_3 (figura A3.15), més propera a la conformació de bot que postulen que adopta l'estat de transició, seria la causa que per a aquests substrats el canvi conformacional sigui més ràpid que no en el cas dels aril α -D-glucopiranosids. A aquesta interpretació donada pels autors s'ha d'afegir que, d'igual manera que s'ha comentat en el cas de les neuraminidases de *Salmonella typhimurium* i de *Clostridium perfringens*, aquest canvi conformacional proposat o es tracta d'una etapa irreversible, de manera que quedi reflectit tant en k_{cat} com en k_{cat}/K_M o bé en el mecanisme de reacció es dona més d'un canvi conformacional, un anterior a l'etapa de glicosidació i un altre posterior a la mateixa, com es postula per a la β -galactosidasa *lacZ* d'*Escherichia coli*.

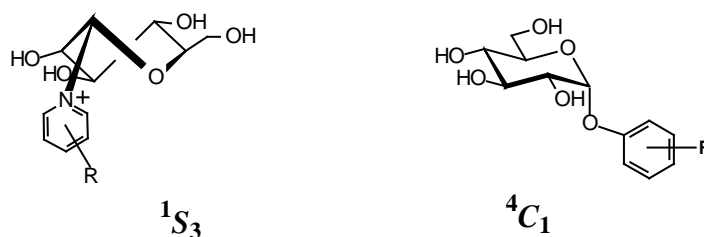


Figura A3.15. Conformació adoptada en solució per les sals d' N - α -D-glucopiranosilpiridini (esquerra) i els aril α -D-glucopiranosids (dreta).

Tant per al lisozim de clara d'ou com per a la β -glucuronidasa lisosomal del fetge de rata es fan cinètiques amb una família d'aril O - β -D-glicòsids amb substituents donadors i acceptors de càrrega. En els dos casos s'obtenen gràfics de Hammett en k_{cat} enfront de la σ del substituent bifàsics, amb una curvatura còncaua ascendent i on el canvi de pendent es dona exactament a la sigma corresponent al fenol no substituït (figura A3.16 i A3.19). En enzimologia no solen observar-se aquest tipus de gràfics de Hammett, però

en química orgànica són freqüents, i la interpretació que se'n fa és que els dos grups de substrats reaccionen a través de mecanismes diferents [32].

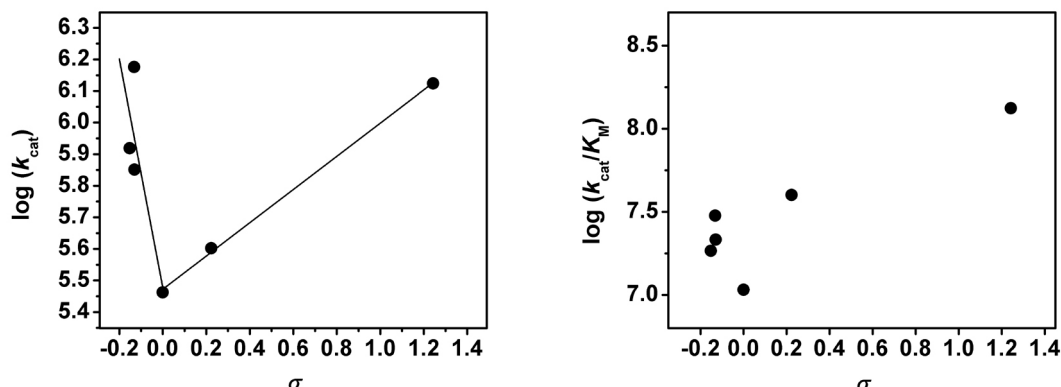


Figura A3.16. Anàlisi de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M per al lisozim de clara d'ou amb una família d'aril O -(β -di- N -acetilquitobiòsids) amb substituents donadors i acceptors de càrrega. En els gràfics es representa el logaritme del paràmetre k_{cat} enfront de la sigma del grup sortint (esquerra) i el logaritme del paràmetre k_{cat}/K_M enfront de la sigma del grup sortint (dreta).

El lisozim de clara d'ou ha estat un enzim molt estudiat a nivell de mecanisme, i s'han realitzat diverses anàlisis de Hammett amb diferents grups de substrats. Al 1967 Lowe *et al.* [33] realitzen una anàlisi amb una família d'aril O -(β -di- N -acetilquitobiòsids) amb substituents acceptors de càrrega, més tard Ballardie *et al.* [34] fan el mateix i inclouen substrats amb grau de polimerització superior. En aquests casos les anàlisis de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M són lineals i amb pendent positiu enfront de la sigma del substituent. Al 1969 Tsai *et al.* fan una altra anàlisi de Hammett amb aril O -(β -di- N -acetilquitobiòsids) però en aquest cas inclouen en l'anell fenòlic substituents tant acceptors com donadors de càrrega, obtenint com a resultat el gràfic de Hammett en k_{cat} que es mostra a la figura A3.16 [32].

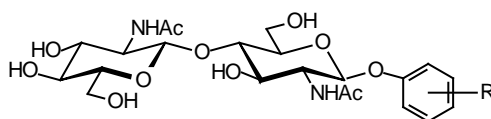
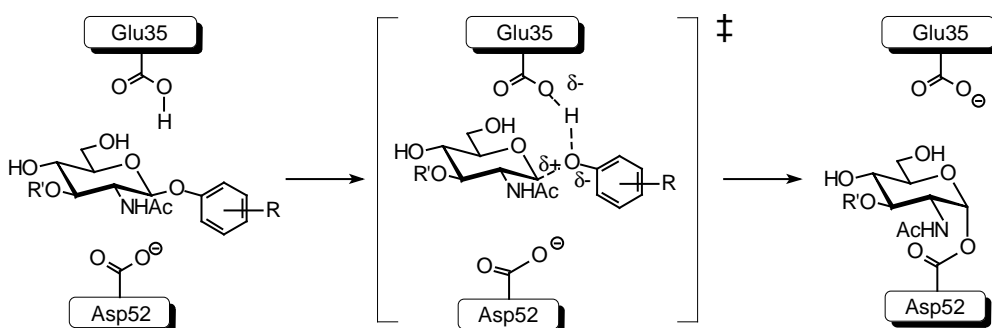


Figura A3.17. Estructura bàsica dels aril O -(β -di- N -acetilquitobiòsids) emprats en les anàlisis de Hammett del lisozim de clara d'ou.

En aquest cas complementen els resultats amb estudis d'efectes isotòpics d' α -deuteri en les cinètiques de reacció, i observen que mentre que els substrats en què les aglicones tenen grups acceptors de càrrega presenten efectes isotòpics, els que tenen grups donadors, no en presenten. Aquests resultats donen suport a dos mecanismes diferents per als dos grups de substrats. Els autors proposen que mentre que els substrats amb grups donadors de càrrega presenten un estat de transició en què la protonació es troba molt avançada, els substrats que tenen grups acceptors, faciliten l'atac nucleofílic. Al 1997 es torna a reprendre el tema, i després de comprovar que la hidròlisi de les dues famílies de substrats té lloc al mateix centre actiu, es dona una explicació dels resultats

en base a les diferents formes d'unió al centre actiu que poden tenir les dues famílies de substrats [35], que complementa l'explicació basada en els efectes electrònics del substrat (figura A3.18). Així, a partir del modelatge molecular del complex enzim-substrat per a un substrat de cada família s'arriba a la conclusió que probablement la plasticitat estructural del lisozim [36] permet induir canvis conformacionals diferencials en la unió de les dues famílies de substrat. En unir el substrat els dos residus catalítics se separen per tal d'acomodar-lo, i es comprova que el substrat amb grup donador de càrrega afavoreix la protonació ja que situa l'oxigen glicosídic més a prop del grup àcid general, i amb una orientació més adequada, que no el substrat amb grup acceptor de càrrega, que afavoreix més l'estabilització de l'ió oxocarbocatiònic per part del nucleòfil per situar-se més a prop del mateix.

ETAPA DE GLICOSIDACIÓ: R: grup donador



ETAPA DE GLICOSIDACIÓ: R: grup acceptor

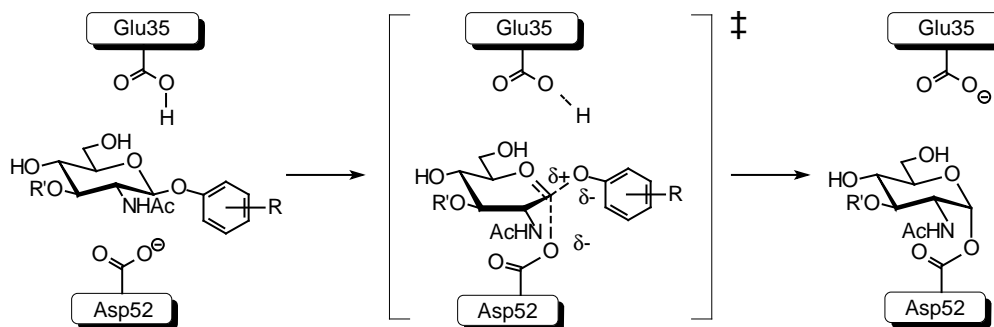


Figura A3.18. Mecanismes proposats per tal d'explicar les anàlisis de Hammett per al lisozim de clara d'ou, que implica un canvi de mecanisme en funció del caràcter de cessor o acceptor de càrrega del substituent del grup fenil i de la proximitat a un o altre residu catalític en la unió del substrat.

Per tal d'explicar els resultats de les anàlisis de Hammett per a la β -glucuronidasa (figura A3.19) es proposa un mecanisme similar, en què es doni un estira i arronsa entre la catàlisi àcida i l'atac nucleofílic, de manera que l'estructura de l'estat de transició canvia a mesura que canvia l'estructura electrònica dels substrats [37]. Amb els substrats que tenen substituents donadors de càrrega hi ha més protonació, ja que

l'oxigen anomèric és més bàsic, i la protonació està afavorida sobre l'atac nucleofílic. Per contra, quan els substituents són acceptors de càrrega, l'oxigen anomèric és menys bàsic i predomina l'atac nucleofílic. D'aquesta forma el que s'observa tant en el gràfic de Hammett en k_{cat} com en el de k_{cat}/K_M és l'etapa de glicosidació dels diferents substrats, com també han demostrat a través d'experiments d'efectes isotòpics de dissolvent en la cinètica de la reacció.

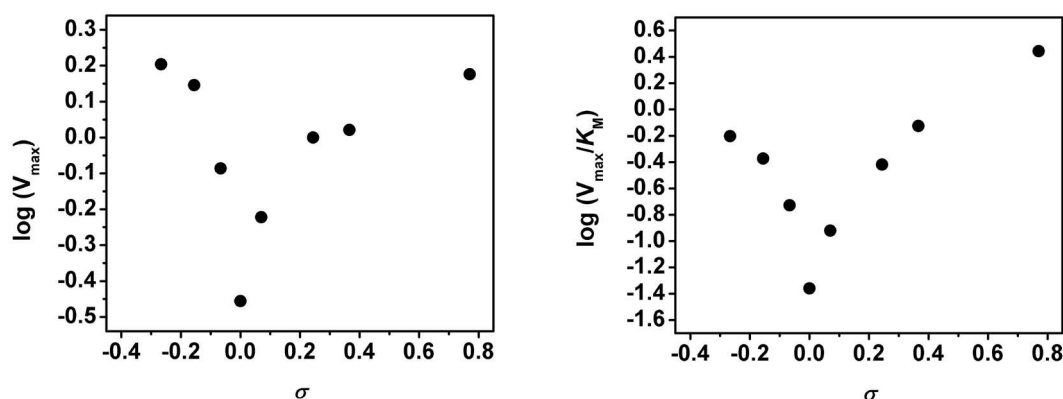


Figura A3.19. Anàlisi de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M per a la β -glucuronidasa lisosomal de fetge de rata amb una família d'àcids aril β -D-glucopiranosidurònics amb substituents donadors i acceptors de càrrega. En els gràfics es representa el logaritme del paràmetre k_{cat} enfront de la sigma del grup sortint (esquerra) i el logaritme del paràmetre k_{cat}/K_M enfront de la sigma del grup sortint (dreta).

A3.5. Anàlisis de Hammett aplicades a mutants de glicosidases

Les anàlisis de Hammett també s'han aplicat a enzims que han estat mutats en residus del centre actiu per tal d'avaluar la influència de les mutacions en el mecanisme enzimàtic. Les mutacions més estudiades són aquelles en què s'ha mutat algun dels residus catalítics. S'espera que les mutacions en el residu que actua d'àcid/base general en les glicosidases que actuen amb retenció de configuració afectin les dues etapes. Mentre que l'efecte de la mutació en l'etapa de desglicosidació és el mateix per a tots els substrats amb la mateixa part glicònica, ja que afecta l'intermedi de reacció, l'efecte en l'etapa de glicosidació, on el que s'està realitzant és eliminar la catàlisi àcida, depèn molt de la naturalesa del substrat, essent mínim per a substrats amb bons grups sortints ($\text{p}K_a$ de l'aglicona baix) i màxim per als substrats menys reactius ($\text{p}K_a$ de l'aglicona alt). De fet, la diferent resposta dels diversos substrats enfront a la mutació permet establir les diferents contribucions del residu àcid general en l'etapa de glicosidació. Per a aquells substrats que no necessiten catàlisi àcida, la disminució de la velocitat (que no és gaire important) aporta informació del paper que juga aquest residu en l'estabilització de l'estat de transició, mentre que la disminució de velocitat per als substrats que requereixen de catàlisi àcida (que sol ser elevada) dóna idea de la importància d'aquest residu en el seu paper de cessor de protons [38]. D'altra banda, a priori sembla que els efectes de mutar el nucleòfil hagin d'afectar només l'etapa de glicosidació, en què aquest realitza l'atac sobre el carboni anomèric, però no s'ha d'oblidar que a l'etapa de desglicosidació el nucleòfil passa a ser el grup sortint.

En el cas de nombroses glicosidasas, en mutar el residu que actua d'àcid/base general per un residu neutre s'ha observat que el desenvolupament de càrrega que es genera en l'oxigen fenòlic és molt superior al de l'enzim salvatge, consistent amb l'absència de catàlisi àcida (figura A3.20). Per exemple, a l'exoglucanasa/xilanasa de *Cellulomonas fimi* el pendent del gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M passa de -0.3 per a l'enzim salvatge [16] a -1 en el mutant E127A [39]; a la β -xilosidasa de *Geobacillus stearothermophilus* T-6, el pendent passa de ser pràcticament 0 per a l'enzim salvatge a -1 en el cas del mutant D495G [40]; un cas similar s'ha observat amb l' α -L-arabinofuranosidasa de *Geobacillus stearothermophilus* T-6 [41, 42] en què el pendent per a l'enzim salvatge és de -0.3 mentre que per al mutant E175A és de -1.3 (figura A3.20). Altres casos similars són els de l'*O*- β -*N*-acetilglucosaminidasa humana [43], la β -xilosidasa de *Bacillus stearothermophilus* [44] i la sialidasa de *Micromonospora viridifaciens* [45].

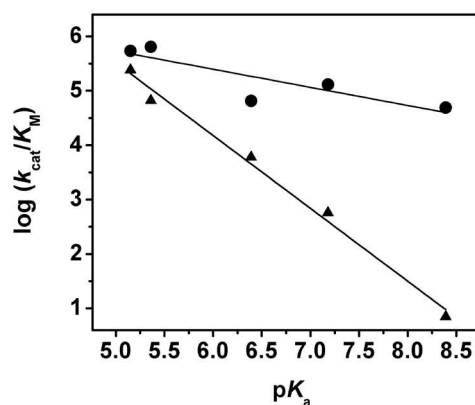


Figura A3.20. Anàlisi de Hammett en k_{cat}/K_M per a l'enzim salvatge (●) i el mutant E175A (▲) de l' α -L-arabinofuranosidasa de *Geobacillus stearothermophilus* T-6. En el gràfic es representa el logaritme de la k_{cat}/K_M enfront del pK_a de l'aglicona.

En base al mateix principi s'observa que en l'anàlisi de Hammett en k_{cat}/K_M d'una *O*-*N*-acetilglucosaminidasa humana realitzat amb una família de tioglicòsids (compostos en les que l'àtom de sofre és més difícil de protonar) el pendent és de -0.93, mentre que fent servir una família d'*O*-glicòsids el pendent és de -0.11 [46].

En un altre ordre, l'efecte provocat per la mutació en l'etapa de desglicosidació a través de cinètiques en estat estacionari només es pot comprovar en aquells casos en què es disposa de substrats per als que aquesta etapa sigui la determinant de la velocitat de reacció. Per exemple, en el cas de la β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* s'ha comprovat que, en mutar el residu que actua d'àcid/base general per un residu neutre, la disminució de la velocitat per a l'etapa de desglicosidació és de l'ordre de 10^3 vegades, i s'ha observat que en general per a aquest enzim l'etapa de desglicosidació es veu més afectada per la mutació que no pas la de glicosidació [47], ja que augmenta el nombre de substrats per als que la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció respecte de l'enzim salvatge [7]. En el cas de la β -xilosidasa de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* passa just el contrari, i amb una disminució en k_3 de 8 vegades la glicosidació passa a ser determinant de la velocitat de reacció per a una sèrie de substrats per als que en l'enzim salvatge ho és l'etapa de desglicosidació [48] (figura A3.21).

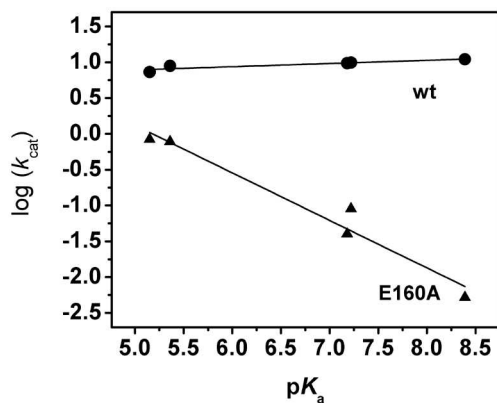


Figura A3.21. Anàlisi de Hammett en k_{cat} de l'enzim salvatge (●) i el mutant en el residu àcid general (E160A) (▲) de la β -xilosidasa de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. En el gràfic es representa el logaritme de k_{cat} enfront del pK_a de l'aglicona.

Altres estudis sobre el residu àcid/base general inclouen aquells en què el que es busca amb la mutació és augmentar o disminuir la distància entre els dos residus catalítics [49]. Aquest estudi s'ha aplicat a la xilanasa de *Bacillus circulans*, comprovant que els pendents en el gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M són molt similars i concloent, per tant, que la longitud del residu que actua d'àcid/base general no afecta significativament el grau de protonació de l'estat de transició a l'etapa de glicosidació. La distància entre residus o, el que és similar, el posicionament dels residus catalítics també s'ha estudiat a través de mutacions que afecten la longitud de cadena del residu que actua com a nucleòfil. Els resultats indiquen que, si bé per a cada glicosidasa l'efecte provocat per una disminució en la longitud del nucleòfil pot afectar de manera diferent les energies relatives associades a les etapes de glicosidació i desglicosidació, no fa variar el grau de desenvolupament de càrrega que es dona en l'estat de transició per a l'etapa de glicosidació. Els exemples els tenim en l'exoglucanasa/xilanasa de *Cellulomonas fimi* [39], la β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* [50] i la xilanasa de *Bacillus circulans* [51], en els que en mutar l'àcid glutàmic que fa de nucleòfil en els tres casos per un àcid aspàrtic, el pendent del gràfic de Hammett en k_{cat}/K_M del mutant és el mateix que el de l'enzim salvatge. En el cas de la xilanasa s'ha assajat també a augmentar la longitud del nucleòfil, obtenint exactament el mateix pendent. Independentment d'això s'ha observat que mentre que a l'exoglucanasa/xilanasa de *Cellulomonas fimi* aquesta mutació provoca una disminució molt més important en la velocitat de l'etapa de desglicosidació que no de la de glicosidació, passant a ser aquesta etapa determinant de la velocitat de reacció per a tots els substrats; per a la β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* passa el contrari i la glicosidació passa a ser l'etapa determinant de la velocitat de reacció per a tots els substrats assajats (figura A3.22).

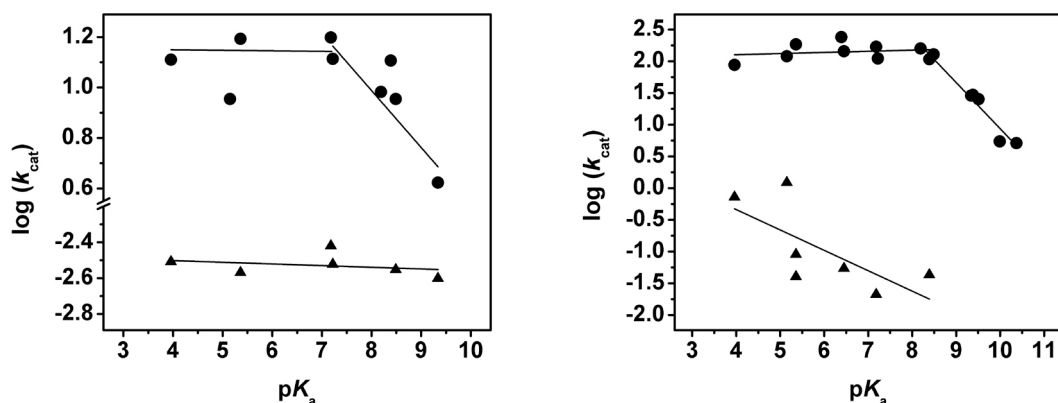


Figura A3.22. Anàlisi de Hammett en k_{cat} de les glicosidases: exoglucanasa/xilanasa de *Cellulomonas fimi* amb una família d'aril β -D-cel·lulooligosacàrids (esquerra) i β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* amb una família d'aril β -D-glucopiranosíds (dreta). En els gràfics es representa el logaritme de k_{cat} enfront del pK_a de l'aglicona. Per a cada enzim es mostren els resultats corresponents a l'enzim salvatge (●), i al mutant en què el glutamat que fa de nucleòfil s'ha mutat per un aspartat (▲).

Apart de les mutacions en els residus catalítics, també s'han realitzat anàlisis de Hammett sobre altres mutants en el centre actiu de diferents glicosidases. Per exemple, la Tyr298 a la β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis*, que ajuda a orientar el nucleòfil i estabilitza la seva càrrega [14], la His205 a l'exoglucanasa/xilanasa de *Cellulomonas fimi*, que es proposa que assisteix estabilitzant la càrrega del nucleòfil en l'etapa de desglicosidació [52], o l'Asn35 a la xilanasa de *Bacillus circulans* [53] que influeix en la definició del pK_a del residu que fa el paper d'àcid/base general.

Donat que una bona correlació entre els $\log(k_{cat}/K_M)$ de dos enzims permet proposar la similitud entre els seus centres actius [54, 55], 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. Aquesta metodologia s'ha aplicat al mutant Tyr298Phe de la β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis*, per al què s'ha observat una bona correlació amb l'enzim salvatge fent servir dues famílies de substrats, una d'aril β -D-glucopiranosíds, en què la diferència entre els substrats està a la part aglicònica ($r^2 = 0.98$), i l'altra de 4'-nitrofenil glicòsids, en què la diferència es troba en la part glicònica ($r^2 = 0.98$). A la vista dels resultats, es conclou que la mutació no afecta significativament les interaccions que s'estableixen amb el substrat a l'estat de transició [14] (figura A3.23).

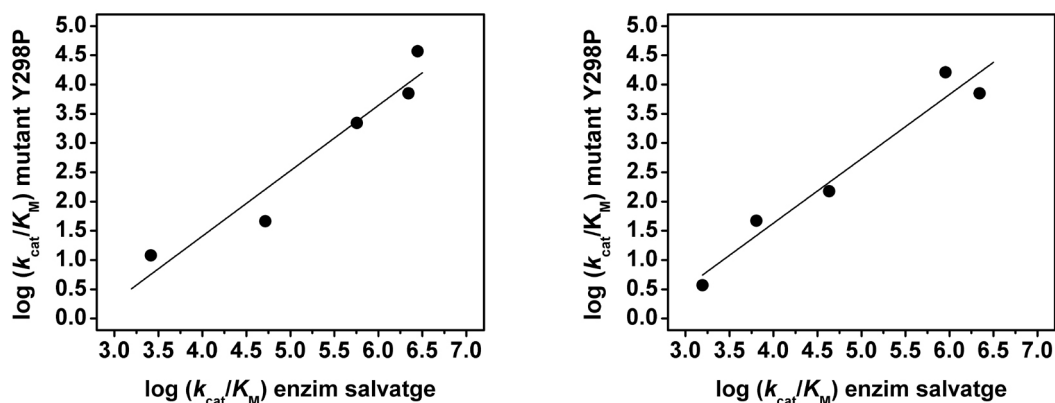


Figura A3.23. Relacions lineals d'energia lliure per tal de comparar l'etapa de glicosidació del mutant Tyr298Phe de la β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* amb la mateixa etapa per a l'enzim salvatge. Es representa el logaritme del terme k_{cat}/K_M del mutant respecte del mateix terme en l'enzim salvatge amb una sèrie d'aril β -D-glucopirànòsids que difereixen en la seva part aglicònica (esquerra) i una altra sèrie de 4'-nitrofenil O - β -D-glicòsids que difereixen en la seva part glicònica (dreta).

Amb els resultats acumulats fins al moment es pot concloure fàcilment que una mutació pot tenir diversos efectes que en la majoria dels casos són difícils de predir: pot afectar el grau de desenvolupament de càrrega en alguna de les etapes de reacció, pot variar les velocitats relatives de les mateixes, o també pot provocar una gran disminució de l'eficiència catalítica de l'enzim sense afectar el mecanisme global de la reacció.

A3.6. Bibliografia

- 1 Hammett, L. P. (1935) Chem. Rev. **17**, 125-136
- 2 Legler, G., Sinnott, M. L., Withers, S. G. (1980) J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1376-1383
- 3 Hosie, L., Sinnott, M. L. (1985) Biochem. J. **226**, 437-446
- 4 Burton, J., Sinnott, M. L. (1983) J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 359-364
- 5 Capon, B. (1969) Chem. Rev. **69**, 407-498
- 6 Bennet, A. J., Sinnott, M. L. (1986) J. Am. Chem. Soc. **108**, 7287-7294
- 7 Kempton, J. B., Withers, S. G. (1992) Biochemistry **31**, 9961-9969
- 8 Li, Y., Chir, J., Chen, F. (2001) Biochem. J. **355**, 835-840
- 9 Vocadlo, D. J., Wicki, J., Rupitz, K., Withers, S. G. (2002) Biochemistry **41**, 9727-9735
- 10 Vocadlo, D., Withers, S. G. (2005) Biochemistry **44**, 12809-12818
- 11 Zechel, D. L., Reid, S. P., Stoll, D., Nashiru, O., Warren, R. A. J., Withers, S. G. (2003) Biochemistry **42**, 7195-7204
- 12 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
- 13 Dale, M. P., Kopfler, W. P., Chait, I., Byers, L.D. (1986) Biochemistry **25**, 2522-2529

- 14 Gebler, J. C., Trimbur, D. E., Warren, R. A. J., Aebersold, R., Namchuk, M., Withers, S. G. (1995) *Biochemistry* **34**, 14547-14553
- 15 Dale, M. P., Ensley, H. E., Kern, K., Sastry, K. A. R., Byers, L. D. (1985) *Biochemistry* **24**, 3530-3539
- 16 Tull, D., Withers, S. G. (1994) *Biochemistry* **33**, 6363-6370
- 17 Lee, S. S., Yu, S., Withers, S. G. (2003) *Biochemistry* **42**, 13081-13090
- 18 Guo, X., Sinnott, M. L. (1993) *Biochem. J.* **294**, 653-656
- 19 Li, Y.-K., Yao, H.-J., Pan, I.-H. (2000) *J. Biochem.* **127**, 315-320
- 20 Guo, X., Laver, W. G., Vimr, E., Sinnott, M. L. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5572-5578
- 21 Eneyskaya, E. V., Ivanen, D. R., Bobrov, K. S., Isaeva-Ivanova, L. S., Shabalin, K. A., Savel'ev, A. N., Golubev, A. M., Kulminskaya, A. A. (2007) *Arch. Biochem. Biophys.* **457**, 225-234
- 22 Cogoli, A., Semenza, G. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 7802-7809
- 23 Nath, R. L., Rydon, H. N. (1954) *Biochem. J.* **57**, 1-10
- 24 Hall, A. N., Hollingshead, S., Rydon, H. N. (1961) *J. Chem. Soc.*, 4290-4295
- 25 Kelly, M. A., Sinnott, M. L., Herrchen, M. (1987) *Biochem. J.* **245**, 843-849
- 26 Varghese, J. N., McKimm-Breschkin, J. L., Caldwell, J. B., Kortt, A. A., Colman, P. M. (1992) *Proteins* **14**, 327-332
- 27 Chou, D. T. H., Watson, J. N., Scholte, A. A., Borgford, T. J., Bennet, A. J. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 8357-8364
- 28 Sinnott, M. L., Withers, S. G. (1974) *Biochem. J.* **143**, 751-762
- 29 Richard, J. P., Westerfeld, J. G., Lin, S. (1995) *Biochemistry* **34**, 11703-11712
- 30 Sinnott, M. L., Souchart, I. J. L. (1973) *Biochem. J.* **133**, 89-98
- 31 Hall, A. N., Hollingshead, S., Rydon, H. N. (1962) *Biochem. J.* **84**, 390-394
- 32 Tsai, C. S., Tang, J. Y., Subbarao, S. C. (1969) *Biochem. J.* **114**, 529-534
- 33 Lowe, G., Sheppard, G., Sinnott, M. L., Williams, A. (1967) *Biochem. J.* **104**, 893-899
- 34 Ballardie, F. W., Capon, B., Cuthbert, M. W., Dearie, W. M. (1977) *Bioorg. Chem.* **6**, 483-509
- 35 Tsai, C. S. (1997) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **29**, 325-334
- 36 Morton, A., Matthews, B. W. (1995) *Biochemistry* **34**, 8576-8588
- 37 Wang, C.-C. and Touster, O. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 2650-2656
- 38 Richard, J. P. (1998) *Biochemistry* **37**, 4305-4309
- 39 MacLeod, A. M., Tull, D., Rupitz, K., Warren, R. A. J., Withers, S. G. (1996) *Biochemistry* **35**, 13165-13172
- 40 Bravman, T., Belakhov, V., Solomon, D., Shoham, G., Henrissat, B., Baasov, T., Shoham, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 26742-26749
- 41 Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, D., Shoham, G., Baasov, T., Shoham, Y. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 43667-43673
- 42 Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, D., Gilead-Gropper, S., Baasov, T., Shoham, G., Shoham, Y. (2002) *FEBS Lett.* **514**, 163-167
- 43 Cetinbas, N., Macauley, M. S., Stubbs, K. A., Drapala, R., Vocadlo, D. J. (2006) *Biochemistry* **45**, 3835-3844
- 44 Bravman, T., Mechaly, A., Shulami, S., Belakhov, V., Baasov, T., Shoham, G., Shoham, Y. (2001) *FEBS Lett.* **495**, 115-119
- 45 Watson, J. N., Newstead, S., Dookhun, V., Taylor, G., Bennet, A. J. (2004) *FEBS Lett.* **577**, 265-269
- 46 Macauley, M. S., Stubbs, K. A., Vocadlo, D. J. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 17202-17203

- 47 Wang, Q., Trimbur, D., Graham, R., Warren, R. A. J., Withers, S. G. (1995) *Biochemistry* **34**, 14554-14562
- 48 Vocadlo, D. J., Wicki, J., Rupitz, K., Withers, S. G. (2002) *Biochemistry* **41**, 9736-9746
- 49 Lawson, S. L., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G. (1997) *Biochemistry* **36**, 2257-2265
- 50 Withers, S. G., Rupitz, K., Trimbur, D., Warren, R. A.J. (1992) *Biochemistry* **31**, 9979-9985
- 51 Lawson, S. L., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G. (1996) *Biochemistry* **35**, 10110-10118
- 52 Notenboom, V., Birsan, C., Nitz, M., Rose, D. R., Warren, R. A. J., Withers, S. G. (1998) *Nat. Struct. Biol.* **5**, 812-818
- 53 Joshi, M. D., Sidhu, G., Pot, I., Brayer, G. D., Withers, S. G., McIntosh, L. P. (2000) *J. Mol. Biol.* **299**, 255-279
- 54 Withers, S. G., Rupitz, K. (1990) *Biochemistry* **29**, 6405-6409
- 55 Bauer, M. W., Kelly, R. M. (1998) *Biochemistry* **37**, 17170-17178

Apèndix 4. Hidròlisi enzimàtica processiva de glicòsids

A4.1. Hidròlisi processiva de glicòsids 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 [1, 2]: 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 a 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 [3, 4].

Les glicosidases processives han adoptat diferents estratègies per tal d'assolir aquesta processivitat. En alguns casos s'observen centres d'unió de lligand addicionals, ja sigui dins del mateix domini proteic, o bé com a centres d'unió externs (CBM). En d'altres casos s'ha adaptat l'arquitectura del centre actiu, ja sigui amb llaços que cobreixen total o parcialment el centre actiu, ja sigui amb una disposició concreta de residus que afavoreixen la fixació i/o el lliscament del substrat després dels esdeveniments catalítics. En aquest sentit, s'ha descrit que hi ha una certa relació entre el grau de tancament del centre actiu i el grau de processivitat dels enzims [4, 5]. En general, les proteïnes processives que no tenen un centre actiu tancat solen tenir centres actius extensos per on llisca el substrat. Aquesta translocació del substrat s'ha aconseguit principalment amb dues estratègies diferents. D'una banda per una afinitat per substrat similar dels diferents subetis que conformen el centre actiu, o de l'altra, a través de canvis conformacionals, amb una unió preferent de la forma productiva enfront de la no productiva.

Tot i que l'atac múltiple del substrat (que és com es va anomenar en un principi a la processivitat) entre les glicosidases es va descriure inicialment per a α - i β -amilases [1, 6], fins al moment les cel·lulases constitueixen el grup de glicosidases processives més estudiades. Dins d'aquest grup, les cel·lobiohidrolases solen tenir centres actius extensos recoberts per un o més llaços que els donen la forma final de túnel, envoltant totalment el substrat. En un principi es va pensar que l'establiment de la interacció enzim-substrat tenia lloc per un extrem del centre actiu i que la cadena polisacàridica anava lliscant cap a l'altre extrem a mesura que s'anava hidrolitzant. Aquesta proposta es basava en el fet que la mutació del Trp272 de la cel·lobiohidrolasa Cel6A de *Trichoderma reesei*, que se situa a l'entrada del centre actiu, evita l'activitat de l'enzim sobre la cel·lulosa cristal·lina [7]. Es postula que aquest residu, que està conservat a totes les cel·lobiohidrolases de la família 6, però que no es troba a les endoglucanases de la mateixa família, guiaria la cadena de glucà dins del centre actiu. Per analogia, es postula que la Phe232 que se situa a l'entrada de l'esclatxa d'unió de la quitinasa A [8] i les dues fenilalanines que es troben a l'entrada del centre actiu de l'exo-1,3- β -glucanasa del fong *Candida albicans* [9], tenen un paper similar guiant i introduint la cadena de substrat dins del centre catalític. Finalment, però, sembla que l'opció més probable per a la formació del complex enzim-substrat és l'obertura dels llaços que cobreixen el centre actiu, de manera que la cadena de polisacàrid es pugui unir al llarg del canal. El

posterior tancament dels mateixos proporciona les condicions per a la processivitat. A la cel·lulasa Cbh A de *Cellulomonas fimi* s'observa que, en suprimir un dels llaços que formen el centre actiu, millora l'activitat endoglucanasa, indicant que el llaç està implicat en processivitat [10]. De forma similar, diverses mutacions, supressions i formació de ponts disulfur que afecten el llaç que conforma el sostre del centre actiu en forma de túnel de la cel·lobiohidrolasa Cel7A de *Trichoderma reesei*, demostren que aquest llaç facilita la degradació processiva de la cel·lulosa cristal·lina [11]. En la Cel6A de *Trichoderma reesei* es proposa que la flexibilitat dels llaços que formen el túnel forma part del mecanisme per tal d'assistir en el lliscament del substrat al llarg del centre actiu; a més, el canvi conformacional trenca interaccions que hi ha entre els residus catalítics i pot ajudar definint els seus estats de protonació [12]. A les α -amilases de mamífers també s'atribueix el paper d'assistir en la processivitat de l'enzim a un llaç mòbil que interacciona amb els subetis de -2 a +2 un cop unit el substrat [13-15]. Segons aquesta proposta, el paper dels residus hidrofòbics situats a l'entrada del centre actiu no és tant el d'introduir la cadena de polisacàrid al centre actiu, com el de guiar-la i sostenir-la durant les etapes de processivitat.

Gràcies al gran nombre d'estructures cristal·logràfiques de complexos glicosil-enzim de què es disposa, s'ha pogut descriure a nivell estructural com té lloc aquesta hidròlisi processiva en el cas de dues glicosidases. Aquests són dos exemples molt reeixits que, d'una banda, permeten explicar les diferents formes d'unió observades en els diferents complexos, i de l'altra, donen una base estructural per a les etapes de lliscament del substrat dins del centre actiu.

Cel·lulasa Cel48F de *Clostridium cellulolyticum*

La cel·lulasa Cel48F de *Clostridium cellulolyticum*, té un centre d'unió format per un túnel que connecta amb una esclatxa, i el centre actiu està al final del túnel abans de l'esclatxa [16]. El túnel és el responsable de retenir la cadena de cel·lulosa durant la degradació processiva, mentre la cel·lobiosa, que és el producte de reacció, s'allibera per la banda de l'esclatxa. S'ha cocrystal·litzat l'enzim salvatge amb diferents inhibidors [16, 17], i també s'ha aconseguit cristal·litzar un mutant inactiu, el E55Q, amb dos mol·lècules de substrat diferents, la cel·lotetraosa, i la cel·lohexaosa [17]. En tots quatre complexos, la densitat de càrrega s'observa en el túnel, però els subetis d'unió no són els mateixos. Els subetis ocupats pels substrats en el mutant coincideixen i constitueixen un conjunt de subetis on es donen una sèrie d'interaccions d'apilament hidrofòbic amb tres triptòfans i una tirosina, i diversos ponts d'hidrogen amb mol·lècules d'aigua i residus polars/carregats que s'alineen al túnel. Tanmateix, els inhibidors ocupen un segon grup de subetis una mica menys definits i que comporta unes altres interaccions amb els residus hidrofòbics del centre actiu. La comparació dels dos grups de subetis d'unió mostra que el grup ocupat per les mol·lècules de substrat està desplaçat mitja unitat de glucopiranososa cap al centre actiu (figura A4.1). El fet que els subetis obtinguts en la unió dels substrats estiguin ben definits fan pensar que aquests són els que mantenen el substrat en la posició apropiada per a la catàlisi. Alhora, el fet que el moviment d'algunes cadenes laterals generi l'altre grup de subetis intermedis, fa que es redueixi la barrera energètica associada a la translocació del substrat i promou el lliscament. De fet, no només el moviment d'algunes cadenes laterals, sinó també la presència de diversos residus aromàtics a l'interior del túnel permet reduir la barrera energètica lligada al lliscament del substrat, per l'establiment d'interaccions d'apilament

hidrofòbic, favorables energèticament, espaiades a intervals curts. S'ha descrit una disposició de residus aromàtics similars en estudis de la maltoporina, que transporta cadenes de maltosa a través d'un canal transmembrana [18, 19], la cel·lobiohidrolasa Cel7A de *Trichoderma reesei* [20] i cel·lobiohidrolasa Cel6A d'*Humicola insolens* [21], entre d'altres.

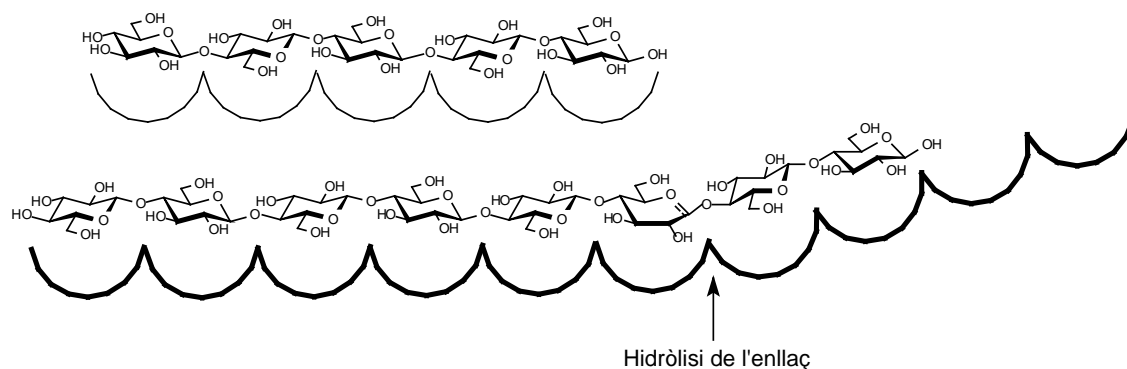


Figura A4.1. Representació en subunitats del centre actiu de la cel·lulasa Cel48F formant complex amb el substrat. En negra es marquen els subunitats corresponents a la unió productiva del substrat (observats en els complexos mutant-substrat), i en un nivell superior es presenten els subunitats alternatius, menys ben definits (observats en els complexos enzim salvatge-inhibidor). El darrer grup de subunitats, que és el que es proposa que ocupa el substrat durant el lliscament, està desplaçat mitja unitat de glucopiranosas cap al punt de tall.

Recentment s'ha obtingut l'estructura dels complexos de dos mutants inactius diferents de la Cel48F, l'E44Q i l'E55Q, amb una hemitiocel·lododecaosa i una hemitiocel·lododecaosa, respectivament, obtenint una bona definició dels lligands tant a la banda del túnel com a la banda d'esclatxa del centre d'unió de l'enzim [22].

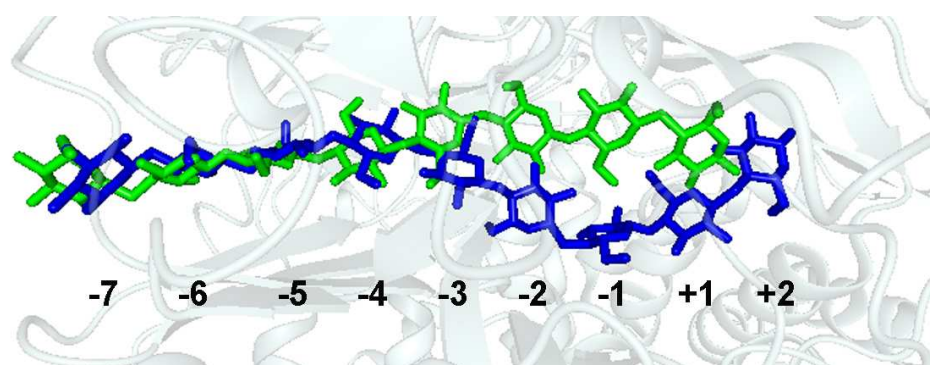


Figura A4.2. Figura parcial del centre d'unió de la Cel48F de *Clostridium cellulolyticum* en què s'observen sobreposades les estructures de dos oligosacàrids obtingudes en dos complexos enzim-lligand diferents. En verd s'observa l'estructura del glicòsid obtinguda de l'estructura cristal·logràfica del complex Cel48F (E44Q)/hemitiocel·lododecaosa, representativa de l'etapa de processivitat, i en blau la del complex Cel48F (E55Q)/hemitiocel·lododecaosa, representativa de la unió productiva.

S'observa que a la banda del túnel els cel·lulooligosacàrids ocupen posicions similars en els dos complexos, però que ocupen dues posicions diferents al centre actiu, en el cas

del mutant E44Q unint-se a la banda superior de la cavitat, i en el mutant E55Q, a la banda inferior, i establint diferents interaccions amb els residus del centre actiu (figura A4.2). Es proposa que aquestes dues formes d'unió diferent puguin correspondre a dos moments diferents del mecanisme enzimàtic, suggerint que la unió observada en el complex amb el mutant E44Q sigui representativa de l'etapa de processivitat, mentre que la que s'observa en el mutant E55Q sigui la unió productiva, que té lloc durant la catàlisi.

Cel·lobiohidrolasa Cel6A d'*Humicola insolens*

L'altre exemple és el de la cel·lobiohidrolasa Cel6A d'*Humicola insolens*, que té un centre actiu en forma de túnel format per dos llaços estesos. S'han obtingut diferents estructures de l'enzim salvatge i mutants de la Cel6A formant complexos amb tio-oligosacàrids no hidrolitzables, que permeten fer una dissecció de la localització del substrat durant la hidròlisi, tant en l'etapa catalítica com en les etapes de processivitat (figura A4.3). De fet s'han distingit tres formes d'unió diferent. S'ha observat la forma d'unió productiva des del subseti -2 fins al +4 a l'estructura cristal·logràfica de l'enzim salvatge amb diferents tio-lligands i amb l'inhibidor isofagomina [21, 23-25]. Apart d'interaccions d'apilament hidrofòbic amb els triptòfans dels subsetis +4, +2, +1 i -2, hi ha aproximadament 15 ponts d'hidrogen directes entre la proteïna i el lligand, i un nombre similar mediat per aigua.

La segona forma d'unió s'ha observat amb el mutant D405N formant complex amb dos tio-compostos, un tetrasacàrid i un pentasacàrid. El pentasacàrid s'uneix al mutant en els subsetis de -1 a +4, mentre que el tetrasacàrid ocupa els subsetis de +1 a +4, i amb totes les unitats de glucopiranososa en conformació de cadira relaxada. Els dos compostos s'uneixen de forma no productiva, de manera que cada unitat de glucopiranososa està girada 180° respecte de l'eix de la cadena del complex en el cas de la unió productiva. Aquest posicionament inusual dels sucres va acompanyat per la reorientació del residu que fa d'àcid catalític, segurament per tal d'evitar impediments estèrics, dels triptòfans que estan implicats en interaccions d'apilament hidrofòbic, i de les interaccions per ponts d'hidrogen. En aquest punt és bo recordar que la cel·lulosa està formada per unitats de glucosa unides per enllaços β -1,4, i que això suposa que, en una cadena del polímer, les unitats de glucopiranososa consecutives estan girades 180° l'una respecte de l'altra. Donat que la hidròlisi només es dona amb una de les dues orientacions obtenint cel·lobiosa com a producte de reacció, en un enzim que actua processivament, un mateix subseti ha de ser capaç d'acomodar les dues orientacions. En aquests complexos no productius, representatius de l'estat intermedi en l'etapa de lliscament [21], la majoria de les interaccions per pont d'hidrogen estan mediatades per aigua, a diferència del que passa en la unió productiva. Finalment, en un complex del mutant D416A amb un tio-pentasacàrid s'observa una situació intermèdia [23], en què les unitats de sucre estan situades entre les dues orientacions descrites. En aquest complex totes les unitats de glucopiranososa estan en conformació de cadira relaxada i hi ha moviment d'alguns elements de l'estructura secundària de la proteïna. Aquest complex mostra el principi de l'etapa de lliscament, en què les unitats de glucopiranososa se situen entre els subsetis. Mentre que la unió productiva es caracteritza per la complementaritat entre el lligand i la proteïna, el lliscament de la cadena implica trencament d'aquesta xarxa, que es veu reemplaçada per una barreja complexa d'interaccions mediatades per molècules d'aigua i

per la flexibilitat de les superfícies hidrofòbiques proporcionades per un seguit de residus de triptòfan.

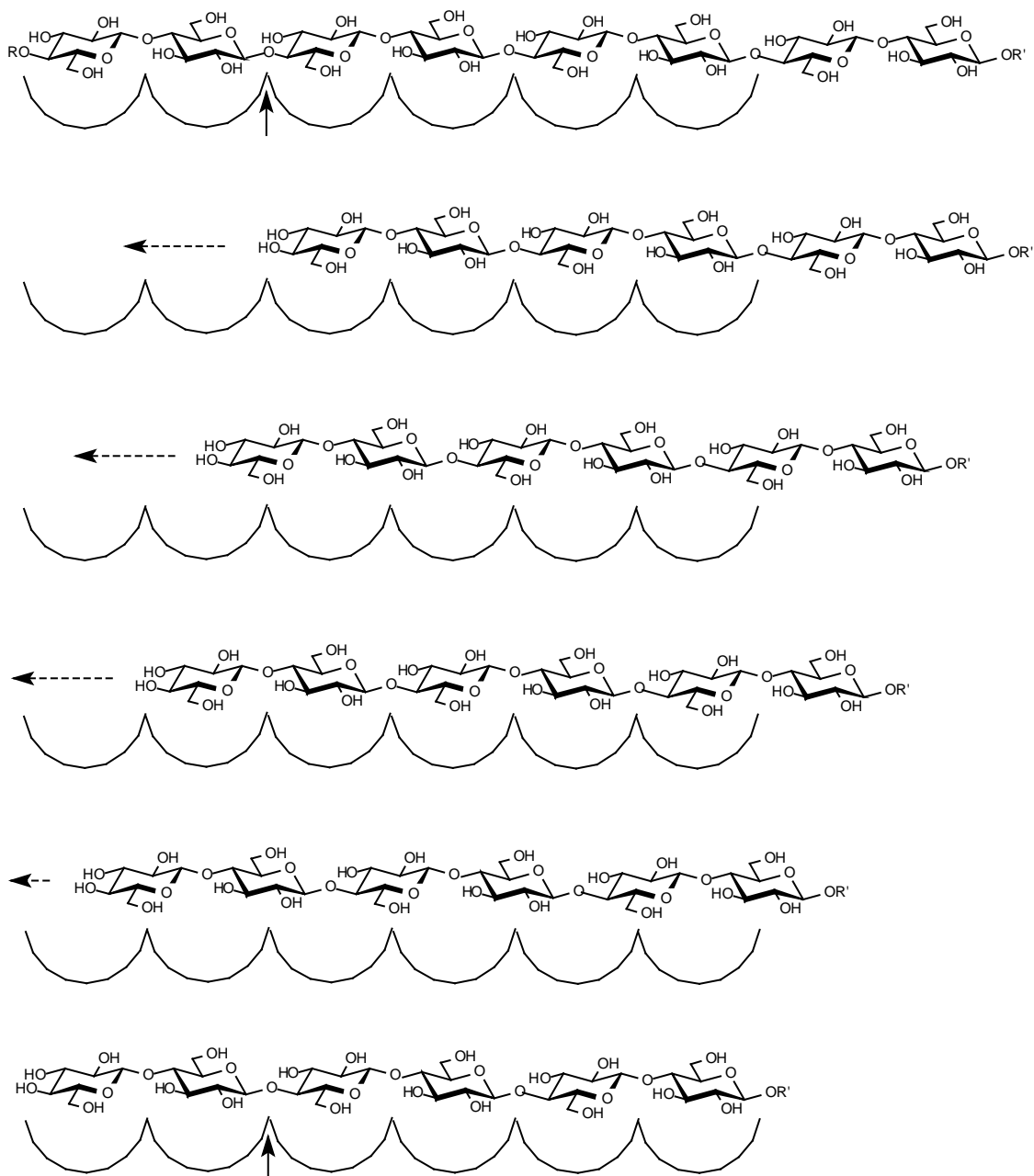


Figura A4.3. Hidròlisi processiva del substrat per la cel·lobiohidrolasa Cel6A d'*Humicola insolens*. En l'esquema es presenten els diferents complexos enzim-substrat que es proposa que es donen entre dos cicles catalítics. El punt d'hidròlisi es marca amb una fletxa vertical en els dos complexos en què hi ha unió productiva. Després d'una primera etapa catalítica amb alliberament de cel·lobiosa, l'extrem no-reductor de la cadena llisca a través del centre actiu formant diferents complexos no productius fins que el substrat torna a trobar-se correctament posicionat per a la catàlisi.

A4.2. Estructura del centre actiu en glicosidases processives

De la mateixa manera que no es pot generalitzar que tots els enzims que tenen un centre actiu estès són processius, tampoc és generalitzable que les glicosidases que no tenen un centre actiu en forma de túnel no siguin processives. Dos exemples clars del primer cas són les endoglucanases no processives E2 de *Thermomonosporum fusca* i l'endoglucanasa Cel7B, homòlogues a les cel·lobiohidrolases Cel6A i Cel7A, respectivament, amb la diferència que les endoglucanases no tenen els llaços que tanquen el centre actiu de les cel·lobiohidrolases i com a conseqüència tenen centres actius oberts en forma d'esclatxa [26, 27]. Pel que fa a glicosidases processives que no tenen un centre actiu en forma de túnel, l'endocel·lulasa E4 de *Thermomonospora fusca* i la Cel9A de *Thermobifida fusca* tenen centres actius en forma d'esclatxa, i tot i així són processives [28-30]. De forma similar, les quitinases A i B de *Serratia marcescens*, que hidrolitzen la quitina de forma processiva [11, 21, 31-33], tenen centres actius en forma d'esclatxa [34], en el cas de la quitinasa B, parcialment cobert per un llaç [35]. D'aquests quatre enzims es proposa que en la Cel9A i en la quitinasa A la interacció del substrat amb els residus aromàtics del centre actiu i dels voltants comporta una unió forta de la cadena de polisacàrid, que propicia la hidròlisi processiva [8, 30, 36], a l'igual que s'ha proposat en el cas de les α -amilases, que també tenen centres actius en forma d'esclatxa [37, 38]. Dos casos similars, però més exagerats són els de les endopoligalacturonases I i II d'*Aspergillus niger*, ja que la mutació d'un únic residu del centre actiu dels enzims (que és obert) és capaç d'eliminar per complet la processivitat [39]. D'altra banda, a la quitinasa B i a l'endoglucanasa E4 es proposa que la processivitat ve mediada per la unió de la cadena de polisacàrid als mòduls d'unió de carbohidrat (CBM) respectivament [28, 35].

A4.3. Mòduls d'unió de carbohidrat (CBM)

Els mòduls d'unió de carbohidrat solen trobar-se en les hidrolases de la paret cel·lular de les plantes, que normalment consisteixen en un mòdul catalític unit a un o més mòduls d'unió de carbohidrat. Fins al moment hi ha descrites 51 famílies de mòduls d'unió de carbohidrat que generen una gran diversitat en l'especificitat per lligand. Al principi, aquests mòduls havien estat observats units a cel·lulosa cristal·lina com a substrat principal [40-42] i per això van rebre el nom de CBD (*Cellulose Binding Domain*); però amb el temps es van veure associats a diferents hidrolases de polisacàrids i se'ls va donar el nom de CBM com a nom més genèric que descriu els mòduls no-catalítics d'unió de sacàrids associats a glicosil hidrolases [43, 44]. Els centres d'unió de carbohidrat tenen dos papers principals. D'una banda es considera que mantenir l'enzim a les proximitats del substrat comporta una major velocitat de degradació del polisacàrid per augment de la concentració d'enzim a la superfície del substrat [45-47]; en aquest sentit, hi ha molts exemples en què l'escissió proteolítica del CBM comporta una disminució de l'activitat enfront del substrat insoluble [42, 46, 48-52]. D'altra banda, resulten ser importants en la definició de l'especificitat per substrat i el mode d'acció de les glicosidases a les que acompanyen. Per exemple, la família 3c de CBM juga un paper transcendental en la processivitat de les cel·lulases de la família 9 [28], i s'ha comprovat que el CBM22 canvia l'especificitat d'una xilanasa de la família 10 de la seva activitat principal xilanasa cap a una activitat β -1,4- β -1,3-glucanasa [53].

Per últim, hi ha evidències que suggereixen que els CBM fúngics direccionen l'enzim a una cara específica del cristall de cel·lulosa [54], i en procariotes CBMs que aparentment tenen les mateixes dianes direccionen el reconeixement del glicòsid cap a diferents regions de les parets cel·lulars de les plantes [55]. Donat que els CBM solen unir-se a substrats insolubles, una altra funció atribuïda als CBM, i que durant molt de temps va ser motiu de controvèrsia, és la seva capacitat de trencar l'estructura cristal·lina polisacàridica, i en mantenir unida la cadena de polisacàrid resultant, evitar que pugui tornar-se a integrar a l'estructura cristal·lina [3, 20, 56-59]. Recentment s'ha demostrat que aquesta és, en efecte, una altra de les funcions que se'ls pot atribuir als CBM, ja que s'ha observat que el CBP21 de *Serratia marcescens* promou la hidròlisi de la quitina cristal·lina a través d'una degradació no hidrolítica del substrat [60]. Per a alguns CBM que estan molt propers al centre actiu, també es proposa que serveixen per tal de direccionar el substrat dins del centre actiu [28, 29].

A4.4. Bibliografia

- 1 Robyt, J. F., French, D. (1967) Arch. Biochem. Biophys. **122**, 8-16
- 2 Robyt, J. F., French, D. (1970) Arch. Biochem. Biophys. **138**, 662-670
- 3 Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K. C., Jones, T. A. (1990) Science **249**, 380-386
- 4 Davies, G. J., Henrissat, B. (1995) Structure **3**, 853-859
- 5 Breyer, W. A., Matthews, B. W. (2001) Protein Sci. **10**, 1699-1711
- 6 Bailey, J. M., French, D. (1956) J. Biol. Chem. **226**, 1-14
- 7 Koivula, A., Kinnari, T., Harjunpää, V., Ruohonen, L., Teerman, A., Drakenberg, T., Rouvinen, J., Jones, T. A., Teeri, T. T. (1998) FEBS Lett. **429**, 341-346; Correction (1999) FEBS Lett. **447**, 334
- 8 Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J., Watanabe, T. (2001) J. Biol. Chem. **276**, 41343-41349
- 9 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
- 10 Meinke, A., Gilkes, N. R., Kilburn, D. G., Miller, R. C. Jr., Warren, R. A. J. (1995) J. Biol. Chem. **270**, 4383-4386
- 11 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
- 12 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
- 13 Qian, M., Nahoum, V., Bonicel, J., Bischoff, H., Henrissat, B., Payan, F. (2001) Biochemistry **40**, 7700-7709
- 14 Quian, M., Haser, R., Buisson, G., Duée, E., Payan, F. (1994) Biochemistry **33**, 6284-6294
- 15 Machius, M., Véttersy, L., Huber, R., Wiegand, G. (1998) J. Mol. Biol. **260**, 409-421
- 16 Parsiegla, G., Juy, M., Reverbel-Leroy, C., Tardif, C., Belaïch, J., Driguez, H., Haser, R. (1998) EMBO J. **17**, 5551-5562
- 17 Parsiegla, G., Reverbel-Leroy, C., Tardif, C., Belaïch, J. P., Driguez, H., Haser, R. (2000) Biochemistry **39**, 11238-11246

- 18 Dutzler, R., Wang, Y.-F., Rizkallah, P. J., Rosenbusch, J. P., Schimer, T. (1996) *Structure* **4**, 127-134
- 19 Meyer, J. E. W., Schulz, G. E. (1997) *Protein Sci.* **6**, 1084-1091
- 20 Divne, C., Stahlberg, J., Teeri, T. T., Jones, T. A. (1998) *J. Mol. Biol.* **275**, 309-325
- 21 Varrot, A., Frandsen, T. P., von Ossowski, I., Boyer, V., Cottaz, S., Driguez, H., Schülein, M., Davies, G. J. (2003) *Structure* **11**, 855-864
- 22 Parsiegla, G., Reverbel-Leroy, C., Tardif, C., Driguez, H. and Haser, R. (2008) *J. Mol. Biol.* **375**, 499-510
- 23 Varrot, A., Frandsen, T. P., Driguez, H., Davies, G. J. (2002) *Acta Cryst.* **D58**, 2201-2204
- 24 Varrot, A., Schülein, M., Davies, G. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 8884-8891
- 25 Varrot, A., MacDonald, J., Stick, R. V., Pell, G., Gilbert, H. J., Davies, G. J. (2003) *Chem. Commun.*, 946-947
- 26 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
- 27 Spezio, M., Wilson, D. B., Karplus, P. A. (1993) *Biochemistry* **32**, 9906-9916
- 28 Sakon, J., Irwin, D., Wilson, D. B., Karplus, P. A. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 810-818
- 29 Irwin, D., Shin, D.-H., Zhang, S., Barr, B. K., Sakon, J., Karplus, P. A., Wilson, D. B. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 1709-1714
- 30 Zhou, W., Irwin, D. C., Escovar-Kousen, J., Wilson, D. B. (2004) *Biochemistry* **43**, 9655-9663
- 31 Teeri, T. T., Koivula, A., Linder, M., Wohlfahrt, G., Divne, C., Jones, T. A. (1998) *Biochem. Soc. Trans.* **26**, 173-178
- 32 Sorbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H., Varum, K. M. (2005) *FEBS J.* **272**, 538-549
- 33 Horn, S. J., Sorbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sorlie, M., Varum, K. J., Eijsink, V. G. H. (2006) *FEBS J.* **273**, 491-503
- 34 Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. B., Chet, I., Wilson, K. S., Vorgias, C. E. (1994) *Structure* **2**, 1169-1180
- 35 van Aalten, D. M. F., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G. H., Wierenga, R. K. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5842-5847
- 36 Watanabe, T., Ishibshi, A., Ariga, Y., Hashimoto, M., Nikaidou, N., Sugiyama, J., Matsumoto, T., Nonaka, T. (2001) *FEBS Lett.* **494**, 74-78
- 37 MacGregor, E. A., Janecek, S., Svensson, B. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1546**, 1-20
- 38 Kramhoft, B., Bak-Jensen, K. S., Mori, H., Juge, N., Nohr, J., Svensson, B. (2005) *Biochemistry* **44**, 1824-1832
- 39 Pagès, S., Kester, H. C., Visser, J., Benen, J. A. (2002) *J. Biol. Chem.* **276**, 33652-33656
- 40 van Tilbeurgh, H., Tomme, P., Claeysens, M., Bhikhabhai, R., Pettersson, G. (1986) *FEBS Lett.* **204**, 223-227
- 41 Tomme, P., van Tilbeurgh, H., Pettersson, G., van Damme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., Teeri, T. T., Claeysens, M. (1988) *Eur. J. Biochem.* **170**, 575-581
- 42 Gilkes, N. R., Warren, R. A.J., Miller, Jr. R. C., Kilburn, D. G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 10401-10407

- 43 Boraston, A. B., McLean, B. W., Kormos, J. M., Alam, M., Gilkes, N. R., Haynes, C. A., Tomme, P., Kilburn, D. G., Warren, R. A. J. (1999) en *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering* (Gilbert H., J., Davies Gideon, J., Henrissat, B. and Svensson, B., eds.), pp. 202-211, Royal Society of Chemistry, Cambridge
- 44 Coutinho, P. M., Henrissat, B. (1999) en *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering* (Gilbert H., J., Davies Gideon, J., Henrissat, B. and Svensson, B., eds.), pp. 3-12, Royal Society of Chemistry, Cambridge
- 45 Black, G. W., Rixon, J. R., Bolam, D. N., Hazlewood, G. P., Theodorou, M. K., Morris, P., Gilbert H. J. (1996) *Biochem. J.* **319**, 515-520
- 46 Bolam, D. N., Ciruela, A., McQueen-Mason, S., Simpson, P., Williamson, M. P., Rixon, J. E., Boraston, A., Hazlewood, G. P., Gilbert H. J. (1998) *Biochem. J.* **331**, 775-781
- 47 Gill, J., Rixon, J. E., Bolam, D. N., McQueen-Mason, S., Simpson, P. J., Williamson, M. P., Hazlewood, G. P., Gilbert H. J. (1999) *Biochem. J.* **342**, 473-480
- 48 Maglione, G., Matsushita, O., Russell, J. B., Wilson, D. B. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3593-3597
- 49 Hall, J., Black, G. W., Ferreira, L. M., Millward-Sadler, S. J., Ali, B. R., Hazlewood, G. P., Gilbert H. J. (1995) *Biochem. J.* **309**, 749-756
- 50 Charnock, S. J., Bolam, D. N., Turkenburg, J. P., Gilbert H. J., Ferreira, L. M. A., Davies G. J., Fontes, C. M. (2000) *Biochemistry* **39**, 5013-5021
- 51 Ali, M. K., Hayashi, H., Karita, S., Goto, M., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. (2001) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 41-47
- 52 Zverlov, V. V., Volkow, I. Y., Velikodvorskaya, G. A., Schwarz, W. H. (2001) *Microbiology* **147**, 621-629
- 53 Araki, R., Ali, M. K., Sakka, M., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. (2004) *FEBS Lett.* **561**, 155-158
- 54 Lethio, J., Sugiyama, J., Gustavsson, M., Fransson, L., Linder, M., Teeri, T. T. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 484-489
- 55 McCartney, L., Gilbert H., J., Bolam, D. N., Boraston, A., Knox, J. P. (2004) *Anal. Biochem.* **326**, 49-54
- 56 Divne, C., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J. K. C., Teeri, T. T., Jones, T. A. (1994) *Science* **265**, 524-528
- 57 Din, N., Damude, H. G., Gilkes, N. R., Miller, R. C. Jr., Warren, R. A. J., Kilburn, D. G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11383-11387
- 58 Southall, S. M., Simpson, P. J., Gilbert, H. J., Williamson, G., Williamson, M. P. (1999) *FEBS Lett.* **447**, 58-60
- 59 Giardina, T., Gunning, A. P., Juge, N., Faulds, C. B., Furniss, C. S., Svensson, B., Morris, W. J., Williamson, G. (2001) *J. Mol. Biol.* **313**, 1149-1159
- 60 Vaaje-Kolstad, G., Houston, D. R., Riemen, A. H. K., Eijsink, V. G. H., van Aalten, D. M. F. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 11313-11319