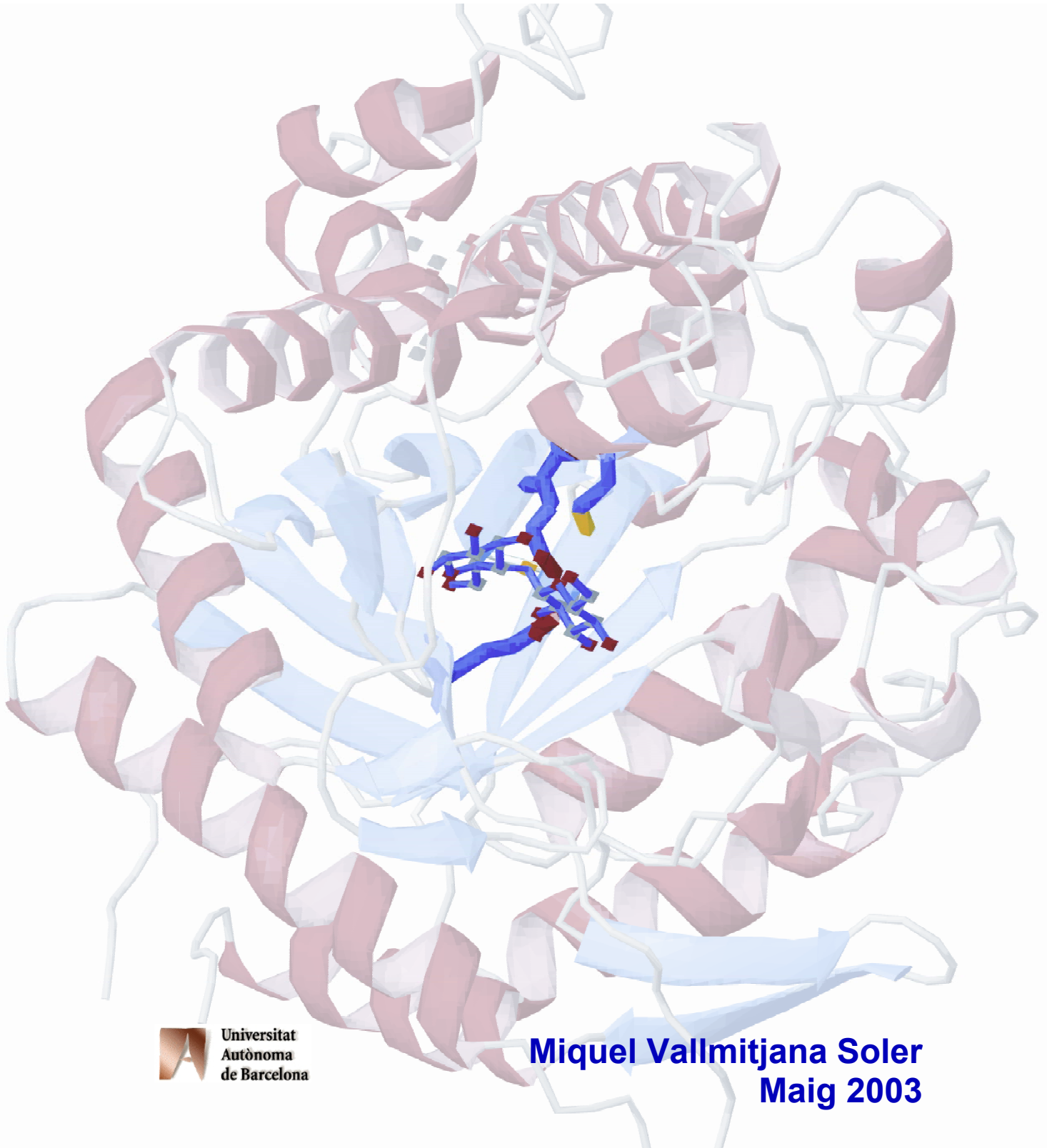


Anàlisi del mecanisme catalític i de l'especificitat de substrat d'una β -glucosidasa de *Streptomyces* sp.



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Institut de Biotecnologia i Biomedicina
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

ANÀLISI DEL MECANISME CATALÍTIC I DE
L'ESPECIFICITAT DE SUBSTRAT D'UNA
 β -GLUCOSIDASA DE *Streptomyces* sp.

Memòria presentada per adquirir el grau de Doctor en Ciències (secció Biologia) per Miquel Vallmitjana Soler, Llicenciat en Biologia.

Treball realitzat a l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la direcció dels Drs. Josep-Antón Pérez-Pons i Enrique Querol Murillo.

Dr. Josep-Antón Pérez-Pons

Dr. Enrique Querol

Cerdanyola, maig de 2003.

TAULA DE CONTINGUTS

Taula de continguts	iii
Abreviatures	v
Sumari	vii
I. Introducció	1
I.1. Els hidrats de carboni	1
I.2. Els enzims que hidrolitzen hidrats de carboni	3
I.3. L'enllaç que s'hidrolitza: l'enllaç glicosídic	5
I.4. El mecanisme catalític de la hidròlisi de l'enllaç glicosídic	7
I.5. Característiques del mecanisme catalític de les β -glucosidases de la família 1	10
I.6. Interaccions no covalents amb el substrat	16
I.7. Síntesi enzimàtica de sucres	18
I.8. Aplicacions industrials de les glucosidases	20
I.9. La β -glucosidasa d' <i>Streptomyces</i>	22
I.10. Objectius	24
II. Articles	
II.1. Clonatge, expressió i cristal·lització de la β -glucosidasa Bgl3.	
II.1.a. Resum	29
II.1.b. Article	31
II.2. Estudis cinètics i mecanisme catalític de la β -glucosidasa Bgl3.	
II.2.a. Resum	37
II.2.b. Article	39
II.3. Especificitat de substrat de la β -glucosidasa Bgl3: anàlisi del paper de la cisteïna 181.	
II.3.a. Resum	49
II.3.b. Article	51
III. Discussió	71
III.1. Obtenció de l'enzim	71
III.2. Mutagènesi dirigida	72
III.3. Els residus catalítics essencials	73
III.4. Interaccions amb el substrat	78
III.5. Activitat glicosintasa	89

IV. Conclusions	95
V. Bibliografia	99
VI. Annex	111
Agraïments	117

Abreviatures.

2,4-DNPG	2,4-dinitrofenil-O- β -D-glucopiranòsid
2,4-DNPGF	2,4-dinitrophenyl-2-deoxy-2-fluoro- β -D-glucopyranoside
2-DFG	2-deoxy-2-fluoro-glucòsid
2-NPG	2-nitrophenyl- β -D-glucoside
3,4-DNPG	3,4-dinitrophenyl- β -D-glucoside
3,5-DNPG	3,5-dinitrophenyl- β -D-glucoside
3-NPG	3-nitrophenyl- β -D-glucoside
4-BrPG	4-bromophenyl- β -D-glucoside
4-NPG	p-nitrofenil- β -D-glucòsid
Bgl3	β -glucosidasa d' <i>Streptomyces</i> sp. (ATCC 11238)
<i>bg3</i>	gen de la Bgl3
BSA	Bovine Serum Albumin
E _a	Energia d'activació
F- α -Gal	fluorur d'alfa-galactosil
F- α -Glu	fluorur d'alfa-glucosil
IPTG	isopropyl- β -thiogalactopyranoside
MUG	4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside
PG	phenyl- β -D-glucoside
pNP	p-nitrofenol
pNPFuc	p-nitrofenil- β -D-fucòsid
pNPG	p-nitrofenil- β -D-glucòsid
pNPGal	p-nitrofenil- β -D-galactòsid
pNPGlu	p-nitrofenil- β -D-glucòsid
pNPMan	p-nitrofenil- β -D-mannòsid
pNPXil	p-nitrofenil- β -D-xilòsid
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis
TR-NOE	Transferred Nuclear Overhauser Effect spectroscopy

SUMARI

Les β -glucosidases són enzims que hidrolitzen enllaços β -glicosídics de disacàrids o oligosacàrids, amb una baixa regioespecificitat de manera que reconeixen específicament l'extrem glucídic no reductor i alhora tenen baixa especificitat per l'extrem reductor o aglicó. El mecanisme catalític és un doble desplaçament amb catàlisi àcid/base i formació d'un intermediari glicosil-enzim; la hidròlisi es produeix amb retenció de la configuració del carboni anomèric. En aquest treball s'ha estudiat la β -glucosidasa Bgl3 d'*Streptomyces* sp. (ATCC 11238) clonada anteriorment al grup, s'ha millorat la producció de l'enzim posant-lo sota control del promotor de la T7-RNA polimerasa, i s'ha millorat el procés de purificació amb la fusió a una cua d'histidines al seu extrem N-terminal que permet l'obtenció de proteïna pura mitjançant un sol pas de purificació (columna d'afinitat). La proteïna obtinguda ha permès l'obtenció de l'estructura tridimensional de l'enzim per cristal·lografia de raigs X.

S'ha caracteritzat l'activitat catalítica de la Bgl3 amb dues bateries de substrats, una que variava l'extrem no reductor per determinar l'especificitat del subseti -1, i l'altre que variava les característiques de l'aglicó amb l'objectiu d'establir una relació lineal d'energia lliure (anàlisi de Hammett). L'estudi de la dependència de l'activitat respecte a la temperatura i al pH, ha permès dilucidar aspectes del mecanisme catalític com l'energia d'activació i la variació dels pK_a dels residus catalítics essencials.

Per mutagènesi dirigida s'han obtingut enzims sense algun dels dos residus catalítics essencials, i s'ha comprovat la reducció de l'activitat catalítica. S'ha comprovat el paper de cada un d'aquests residus a la catàlisi per rescat químic de l'activitat dels mutants amb l'addició d'un nucleòfil extern, i posterior identificació per Ressonància Magnètica Nuclear dels productes formats.

Finalment s'ha avançat en l'estudi de l'especificitat de substrat respecte l'aglicó mitjançant mutagènesi dirigida i caracterització cinètica dels mutants sobre una posició conservada del centre actiu: la cisteïna 181 de la Bgl3.

I. INTRODUCCIÓ

I.1. Els hidrats de carboni

Els hidrats de carboni es troben de forma funcional tant de manera senzilla (monosacàrids) com polimeritzats, formant oligosacàrids o polisacàrids, i constitueixen la font de carboni principal dels éssers vius.

Els dos terços del carboni de la biosfera es troba en forma de carbohidrats. La fixació del CO₂ per les plantes es dona en forma de glucosa mitjançant la fotosíntesi; i la glucosa s'emmagatzema com a reserva energètica en forma de midó, o s'acumula a la fusta en forma de cel·lulosa i hemicel·lulosa. Al llarg d'un any s'acumulen a la biosfera al voltant de 2000 milions de tones de CO₂ en forma de fusta, però sobretot de restes vegetals fossilitzats al sòl. Per a tenir una idea de la magnitud d'aquesta xifra, aquesta quantitat de CO₂ representa només la quarta part del CO₂ alliberat per l'activitat humana per l'ús de combustibles fòssils i la desforestació¹.

Però el paper dels carbohidrats no és només estructural i de reserva energètica. Altres funcions dels carbohidrats són de senyalització cel·lular i la de protecció. En els animals, la funció de protecció es porta a terme al medi extracel·lular per àcids hialurònics i altres mucopolisacàrids, mentre que en plantes l'equivalent són les pectines. El paper de senyalització cel·lular es fa a través d'una multitud de sucres de baix pes molecular (oligosacàrids) que es troben units de forma covalent a lípids i proteïnes. Aquests oligosacàrids tenen una estructura tridimensional complexa i són reconeguts per altres molècules (anticossos, enzims, lectines,...); intervenen així en processos d'invasió vírica i bacteriana, en la resposta immunològica, en la fertilització, en l'adhesió cel·lular, i ja en un nivell molecular,

¹ Myneni *et al* (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98, 26, 14784-14789.

modulen la funció i estabilitat de les proteïnes a les que estan unides, controlant la seva vida mitja i el seu transport a través dels diferents compartiments cel·lulars.

La composició química dels monosacàrids (polihidroxialdehids o polihidroxiketones) i la seva estructura cíclica estable en dissolució, fa que tinguin molta varietat estereoquímica² i que puguin polimeritzar per diversos llocs d'unió³. A la gran varietat d'estereoisòmers s'hi afegeixen les modificacions que poden patir les substitucions hidroxíliques: oxidació a àcid carboxílic, reducció i, per tant, desoxidació, o substitucions per gran varietat de molècules.

La variabilitat estereoquímica es veu molt clara a la Figura 1.1 on estan esquematitzades totes les possibles combinacions amb que es poden unir 2 monòmers de glucosa; en comparació, dos aminoàcids diferents només poden formar 2 dipèptids. Però aquesta variabilitat no es troba en totes les molècules de carbohidrats: els polisacàrids, tant de reserva com estructurals, tendeixen a ser repeticions senzilles d'un o pocs monòmers diferents. Per exemple el midó està format per dos polisacàrids diferents, amilosa i amilopectina. El primer és una cadena molt llarga de glucoses unides per enllaços $\alpha 1 \rightarrow 4$ ⁴; mentre que el segon és similar però amb ramificacions per enllaços $\alpha 1 \rightarrow 6$ cada 24 a 30 glucoses. El glucogen s'assembla a l'amilopectina, però presenta més ramificacions (cada 8 a 12 residus de glucosa). La cel·lulosa té una estructura similar a l'amilosa, però l'enllaç és $\beta 1 \rightarrow 4$ en comptes d' α ; aquest petit canvi li proporciona una estructura cristal·lina a les fibres de cel·lulosa que li donen la rigidesa característica entre altres propietats.

Els carbohidrats, precisament per ser un component abundant a la natura, han constituït una font de matèria primera per a moltes aplicacions humanes:

- en el camp de l'alimentació constitueixen la major part de la dieta en forma de midó provinent de l'arròs, blat i altres cereals, patates, i llegums. Per altra banda els sucres, tant de canya, remolatxa, o de la fruita són disacàrids (sacarosa principalment), com ho és lactosa de la llet.

- pel que fa a les aplicacions de la cel·lulosa, la més típica es troba en el paper i la fibra vegetal com el cotó i el cànem. La fusta conté a més de cel·lulosa, la lignina que és una matriu amorfa que li dóna la resistència característica.

- usos més minoritaris dels carbohidrats són: com a espessidors a la indústria alimentaria, per exemple la pectina de la fruita i l'agar que prové d'algues; la metil-cel·lulosa és un component de la típica cola de paret, com també és un polisacàrid la històrica goma aràbiga. Un altre exemple, i com a botó de mostra de les potencialitats dels carbohidrats a la indústria química, és l'ús de plàstics biodegradables amb base de midó.

² Un parell de molècules estereoisòmeres es diferencien en què una és una imatge especular de l'altre. Com que els monosacàrids tenen molts centres quirals (punts d'isomeria) amb una mateixa estructura química poden haver-hi moltes estereoisòmeres entre elles. Per exemple les aldohexoses amb la fórmula química $C_6H_{12}O_6$, com la glucosa, poden tenir fins 16 estructures de sucre diferents.

³ Éssent polihidroxil ofereixen diversos llocs d'unió al carboni que porta el grup ceto o aldehid (carboni anomèric) d'una altra molècula de monosacàrid.

⁴ $1 \rightarrow 4$ vol dir que el carboni anomèric (C1) està unit a la següent glucosa per l'hidroxil del C4; i α indica la configuració del carboni anomèric.

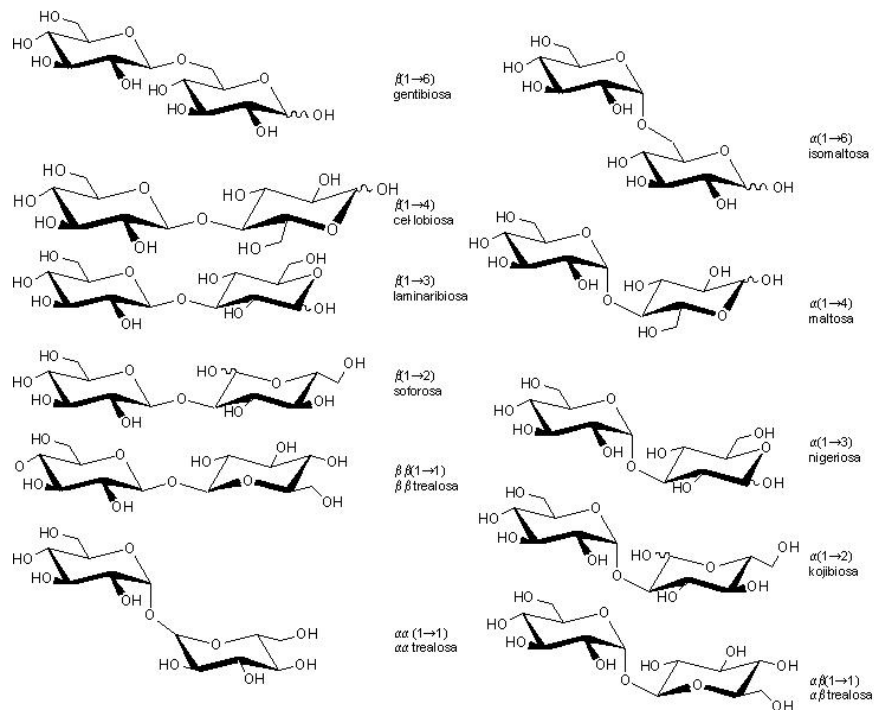


Figura I.1. Possibles combinacions de dues glucoses formant disacàrids.

I.2. Els enzims que hidrolitzen hidrats de carboni

Els enzims catalitzen totes les reaccions químiques que es produeixen normalment als organismes vius. La catàlisi enzimàtica redueix l'energia d'activació de les reaccions químiques i possibilita l'acoblament de reaccions. Els enzims que hidrolitzen l'enllaç glicosídic s'anomenen glicosidases. La *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) va proposar la classificació dels enzims depenent de l'*activitat enzimàtica* que realitzaven⁵. Amb aquesta classificació es van ajuntar les glicosidases dins del grup EC3.2.a.b (veure la taula I.1); el primer dígit correspon al tipus d'activitat enzimàtica (3 correspon a activitat hidrolítica), i el segon dígit correspon al tipus de substrat (2 significa que actuen sobre carbohidrats). El tercer dígit correspon en aquest cas al tipus d'àtom que forma l'enllaç glicosídic; normalment és oxigen (O-), però també hi ha enllaços N- i S- glicosídics. El quart dígit es va reservar pel tipus de substrat: de vegades un mateix substrat és hidrolitzat de diferent manera, per l'extrem (exoglicosidases) o per qualsevol punt de la cadena polisacàridica (endoglicosidases), i això també comporta una diferent classificació de les activitats enzimàtiques.

Aquesta classificació ha estat parcialment substituïda per una altra basada en l'homologia de seqüència⁶. Com la seqüència d'una proteïna porta associada la seva estructura tridimensional,

⁵ <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>

⁶ Henrissat (1991) *Biochem. J.* 280, 309-316; Henrissat i Bairoch (1993) *Biochem. J.* 293, 781-788.

la classificació proposada per Henrissat ho és de fet per l'estructura terciària de les glicosilhidrolases⁷.

Si comparem les dues classificacions es troba que d'acord amb la *classificació estructural* es classifiquen en el mateix grup enzims que actuen sobre substrats diferents, i que estarien en diferents grups d'acord amb la IUBMB. En algun cas, però, la classificació estructural provoca que enzims que no son glicosilhidrolases, però que tenen una similitud molt elevada, s'incloguin en un mateix grup⁸.

Taula I.1. Classificació de les β -glucosidasas segons la IUBMB

Reacció	enllaç	substrat	
EC			
1. Oxidoreductases			
2. Transferases			
3. Hidrolases	1. enllaços ester		
	2. enllaços glicosídics	1. enllaços O glicosídics	1. α -amilasa 2. β -amilasa ... 21. β-glucosidasa ... fins a 136 activitats
		2. enllaços N glicosídics	Fins a 24 substrats diferents
	3. enllaços eter		
	4. enllaços peptídics		
	...		
	7 enllaços C-C		
...			
fins a 13 grups			
4. Liases			
5. Isomerasas			
6. Ligases			

La classificació estructural de les *glicosilhidrolases* està en continua actualització. A l'octubre del 2002 hi havia 87 famílies⁹ i és probable l'aparició de 33 més que correspon al nombre d'enzims sense família que hi havia en aquell moment. En comparació, la classificació en funció del substrat tenia en aquell mateix moment 141 tipus diferents¹⁰.

Els resultats estructurals publicats per un enzim glucohidrolític es poden extrapolar sobre la resta dels enzims de la mateixa família; amb identitats de seqüència superiors al 30%, en general, es manté la mateixa estructura. De la mateixa manera estudis mecanístics també

⁷ Davies i Henrissat (1995) *Structure* 3, 853-859.

⁸ En aquests casos es tracta de proteïnes homòlogues que provenen d'un gen comú i que poden no haver conservat la seva funció (ortòlogues). Un exemple d'això és la trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* que es troba classificada juntament amb sialidasas a la família 33 de les glicosilhidrolases (Buschiazzo *et al* (2000) *EMBO J.* 19, 16-24).

⁹ <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/GH.html>

¹⁰ <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/>

proporcionen dades aplicables a tots els membres de la mateixa família, encara que hi hagi particularitats per a cada enzim.

1.3. L'enllaç que s'hidrolitza: l'enllaç glicosídic

La reacció que catalitzen les glicosilhidrolases consisteix en la hidròlisi d'un enllaç glicosídic. Les característiques químiques d'aquest enllaç són intermèdies entre un èster i un èter; concretament s'anomena *enllaç acetal*. L'estructura cíclica dels sucres s'anomena hemiacetal i està en equilibri amb l'estructura lineal, o sia grup ceto o aldehyd; aquest equilibri està del tot desplaçat cap a la forma cíclica però permet la racemització del carboni anomèric en dissolució¹¹. Un cop el monosacàrid forma l'enllaç glicosídic s'impedeix aquesta racemització. L'enllaç glicosídic es forma entre el carboni anomèric i un hidroxil d'un altre sucre. L'energia d'aquest enllaç és molt elevada, uns 30 kcal/mol, però l'energia d'activació de la hidròlisi és també molt elevada en condicions normals i per tant l'enllaç glicosídic és molt estable. L'enllaç glicosídic és resistent a pH alcalins però és sensible a pH àcids. Un cas concret és la hidròlisi química de la cel·lulosa que necessita unes condicions molt agressives; això és degut a que previament s'ha de dissoldre l'estructura cristal·lina de les fibres de cel·lulosa¹².

L'estabilitat de l'enllaç glicosídic varia segons els substituents de l'*extrem no reductor* o *glicó*¹³, i de la característica de l'altra part de l'enllaç (l'*extrem reductor* o també anomenat *aglicó*¹⁴). Depenent de la reactivitat de l'aglicó la hidròlisi serà més o menys afavorida. Per a tenir una idea de la reactivitat d'aquest enllaç, la velocitat d'hidròlisi no enzimàtica d'un glucòsid molt inestable, el 2,4-dinitrofenil-O- β -D-glucopiranosid (2,4-DNPG)¹⁵, a 37°C és de l'ordre de 6 molècules per segon per cada milió¹⁶. Els disacàrids naturals tenen velocitats d'hidròlisi molt més petites i, per tant, es consideren estables: l'enllaç s'hidrolitza de forma espontània molt més lentament que l'hidròlisi d'enllaços d'altres biopolimers (DNA o proteïnes)¹⁷.

La **hidròlisi no catalitzada**, es pot produir seguint dos possibles mecanismes (Figura I.2):

¹¹ L'estructura dels monosacàrids genera múltiples carbonis quirals; la forma cíclica o hemiacetal fa que el carboni amb el grup ceto o aldehyd generi un altre centre, aquests nous enantiòmers es diuen anòmers i aquest carboni s'anomena anomèric. Racèmic és la barreja dels dos enantiòmers.

¹² Un exemple d'hidròlisi química de la cel·lulosa es pot trobar a Detroy i St Julian (1983) *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 10, 203-228, es tracta d'elevades concentracions d'àcid sulfúric (1-3%) i més de 120°C. Les condicions són tan agressives que es degeneren els monòmers de glucosa a productes no reutilitzables.

¹³ El carboni anomèric, quan és un aldehyd, té poder reductor, però deixa de tenir capacitat d'oxidar-se cap a un extrem carboxílic quan està enllaçat, per això la part de l'enllaç glicosídic que té el carboni anomèric s'anomena extrem no reductor. A Namchuk *et al* (2000) *JACS* 122, 1270-1277 s'estudia l'estabilitat de l'enllaç glicosídic de diferents glucòsids amb els hidroxils substituïts per hidrogen i per fluor.

¹⁴ S'anomena aglicó quan l'enllaç glicosídic uneix un sucre amb un altre compost que té un grup hidroxil per poder-se unir, però no és un sucre. Per extensió també es fa servir per designar l'extrem reductor de disacàrids.

¹⁵ El 2,4-DNPG té una elevada reactivitat, perquè el pK_a de l'aglicó (el 2,4-dinitrofenol) és de 4, molt baix, i per tant quan s'hidrolitza el glucòsid l'aglicó es manté desprotonat; per tant part dels productes s'assemblen als intermediaris de reacció i això fa que l'energia d'activació sigui baixa.

¹⁶ O sia $k=6 \cdot 10^{-6} s^{-1}$ (Namchuk *et al* (2000) *JACS* 122, 1270-1277).

¹⁷ La vida mitja de la cel·lulosa a 25°C i a pH neutre s'ha estimat en 4,7 milions d'anys (Wolfenden *et al* (1998) *JACS* 120, 6814-6815).

1) La major part dels sucres i glicòsids¹⁸ s'hidrolitzen per desplaçament de l'aglicó. El carboni anomèric, que normalment es troba en isomeria sp^3 i, per tant, té els seus substituents en forma de tetraedre, s'hibrida a sp^2 amb els seus substituents en forma plana excepte l'oxigen de l'enllaç glicosídic que es troba perpendicular a aquest pla; amb aquesta conformació una molècula nucleòfila, com un grup hidroxil, pot reaccionar amb el carboni anomèric fent saltar l'aglicó; aquest estarà ionitzat i, depenent del pK_a de l'hidroxil de l'aglicó, agafarà un protó de l'aigua restablint les molècules d'ió hidroxil i per tant sense variar el pH.

2) L'altra possibilitat d'hidròlisi no catalitzada de l'enllaç glicosídic es basa en la reactivitat de l'aglicó i no es dona en sucres normals, només amb aglicons molt reactius¹⁹; un cop ha saltat l'aglicó el carboni anomèric es queda amb una càrrega positiva (intermediari de reacció carbocatiònic) i resta, com amb l'altre mecanisme, en hibridació sp^2 amb els tres únics substituents en un mateix pla; aquest intermediari és inestable i reacciona ràpidament amb un nucleòfil com per exemple un ió hidroxil de l'aigua.

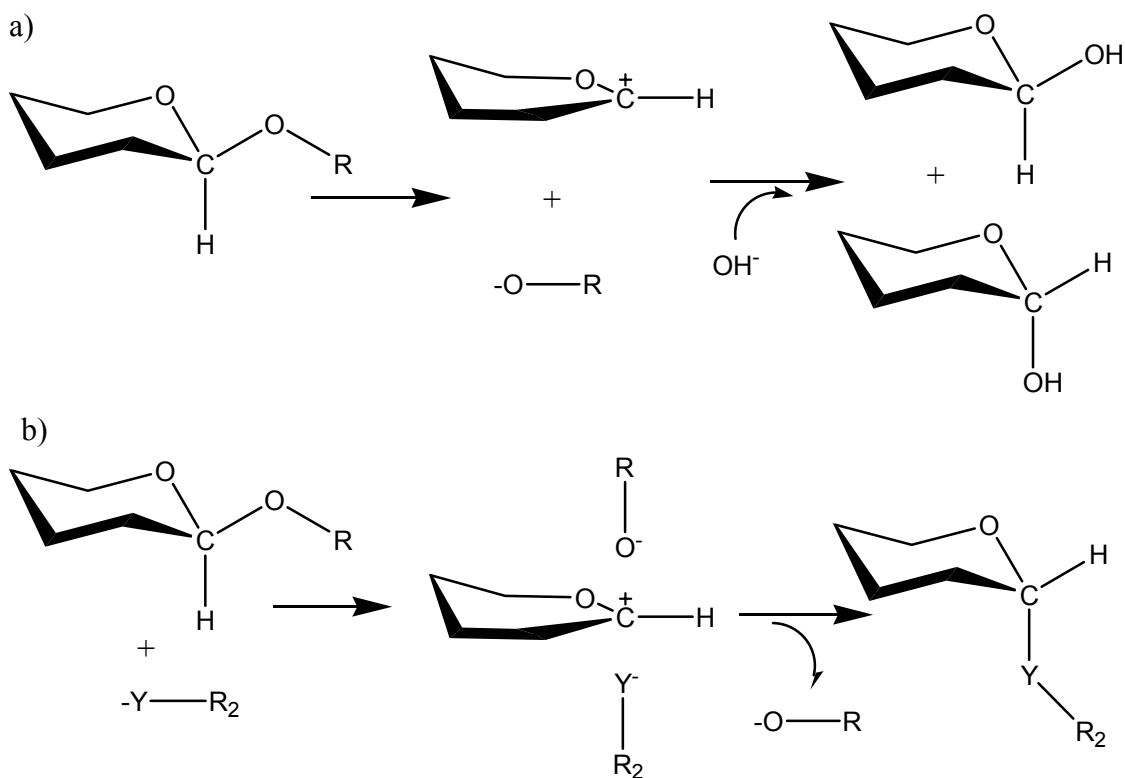


Figura I.2. Mecanisme d'hidròlisi espontània de l'enllaç glicosídic. a) Primer es trenca l'enllaç glicosídic i d'aquesta manera l'aigua pot atacar el carboni anomèric per ambdós costats; el producte és una mescla racèmica de la configuració del carboni anomèric; b) Es produeix un desplaçament del grup sortint per un grup nucleòfil; el producte inverteix la configuració del carboni anomèric.

¹⁸ Un glicòsid és una molècula formada per un monosacàrid unit per enllaç glicosídic a un grup hidroxil d'una altra substància sigui o no un carbohidrat.

¹⁹ Es fa referència a la reactivitat dels nucleòfils en el sentit que absorbeixen bona part dels electrons compartits amb l'oxigen de l'enllaç glicosídic, de manera que aquest oxigen té un caràcter més electròfil, això li permet quedar-se amb els electrons del carboni anomèric trencant l'enllaç glicosídic. Un aglicó amb aquesta característica s'anomena *bon grup sortint*.

La diferència entre aquests dos mecanismes de reacció es pot observar en els productes d'hidròlisi. En el primer cas l'aigua entra pel cantó contrari d'on es troba l'aglicó, i com es tracta d'un carboni quiral, es canvia la configuració del carboni anomèric, que en el producte d'hidròlisi passa a ser la contrària a la del substrat²⁰. En canvi en el segon cas l'ió hidroxil, o qualsevol altre nucleòfil, pot reaccionar amb el carboni anomèric per qualsevol dels dos costats generant una mescla racèmica en la configuració del carboni anomèric. Els dos mecanismes presenten a més una diferent dependència respecte a la concentració de substituent, o sia de l'ió hidroxil o nucleòfil: en el primer cas es tracta d'una reacció típica de segon ordre que depèn de la concentració de cadascun dels reactius, mentre que el segon cas és independent de la concentració del substituent i la velocitat de reacció només depèn de la concentració del glicòsid, essent una reacció de primer ordre.

1.4. El mecanisme catalític de la hidròlisi de l'enllaç glicosídic

Tal com s'ha comentat a l'explicació del mecanisme d'hidròlisi no catalitzada de l'enllaç glicosídic, l'aglicó quan és desplaçat ha d'agafar un protó del medi (assistència acídica); participant a la hidròlisi com a nucleòfil un ió hidroxil (assistència bàsica). Gairebé tots els enzims glicohidrolítics fan servir un mecanisme de catàlisi àcid/base, on l'àcid facilita que salti l'aglicó i la base activa la molècula d'aigua que farà de nucleòfil envers el carboni anomèric. Però s'han descrit dues maneres diferents de fer la catàlisi (Figura 1.3). La diferència que hi ha entre elles és la presència en un cas d'un intermediari glicosil-enzim generat per una catàlisi nucleòfil/àcid²¹; aquest intermediari s'hidrolitza mitjançant una catàlisi bàsica que activa una molècula d'aigua permetent que pugui actuar de nucleòfil sobre el carboni anomèric i així alliberar el substrat de l'enzim. L'altre mecanisme catalític no té l'intermediari covalent, i la catàlisi àcid/base es dona en un sol pas: un residu s'encarrega de la catàlisi àcida mentre un altre ho fa de la bàsica dirigint una molècula d'aigua parcialment ionitzada sobre el carboni anomèric.

Aquests dos mecanismes es diferencien entre ells per la configuració resultant del carboni anomèric del substrat hidrolitzat. Amb l'intermediari glicosil-enzim la molècula d'aigua ataca el substrat pel mateix lloc on estava unit l'aglicó, i per tant es manté la configuració del carboni anomèric. Pel que fa a l'altre mecanisme, l'aigua ataca pel cantó oposat a l'aglicó i per tant s'inverteix la configuració del carboni anomèric.

Els residus catalítics de les glicosidases són generalment àcids carboxílics d'un aspàrtic o d'un glutàmic. En el cas dels enzims que mantenen la configuració del carboni anomèric, el

²⁰ El carboni anomèric un cop reacciona amb un grup hidroxil fent l'enllaç glicosídic fixa la seva configuració.

²¹ A Withers i Street (1988) *JACS* 110, 8551-8553 es va identificar per mètodes directes i per primera vegada l'intermediari covalent. Fins aleshores hi havia el dubte que aquest intermediari tingués un caràcter carbocatiònic estable (Toone *et al* (1989) *Tetrahedron* 45, 5365-5422). Igualment l'intermediari no covalent carbocatiònic s'ha de produir per a formar i desfer aquest intermediari covalent, i pot ser que en algun enzim o substrat l'intermediari carbocatiònic estigui estabilitzat.

residu responsable de la catàlisi àcida és el mateix que en la segona etapa realitza la catàlisi bàsica. En algun cas, en enzims amb substrats naturals amb bon grup sortint com aglicó i que, per tant, no requereixen catàlisi àcida, el residu que generalment actua com a catalitzador àcid/base està substituït per una glutamina que tan sols assisteix en la catàlisi orientant la molècula d'aigua perquè actuï com a nucleòfil²². Hi ha també algun exemple de glicosilhidrolases que no tenen el residu que fa de nucleòfil durant la catàlisi; es tracta d'enzims que hidrolitzen substrats que tenen substituents a la posició C2 que poden actuar de nucleòfils²³.

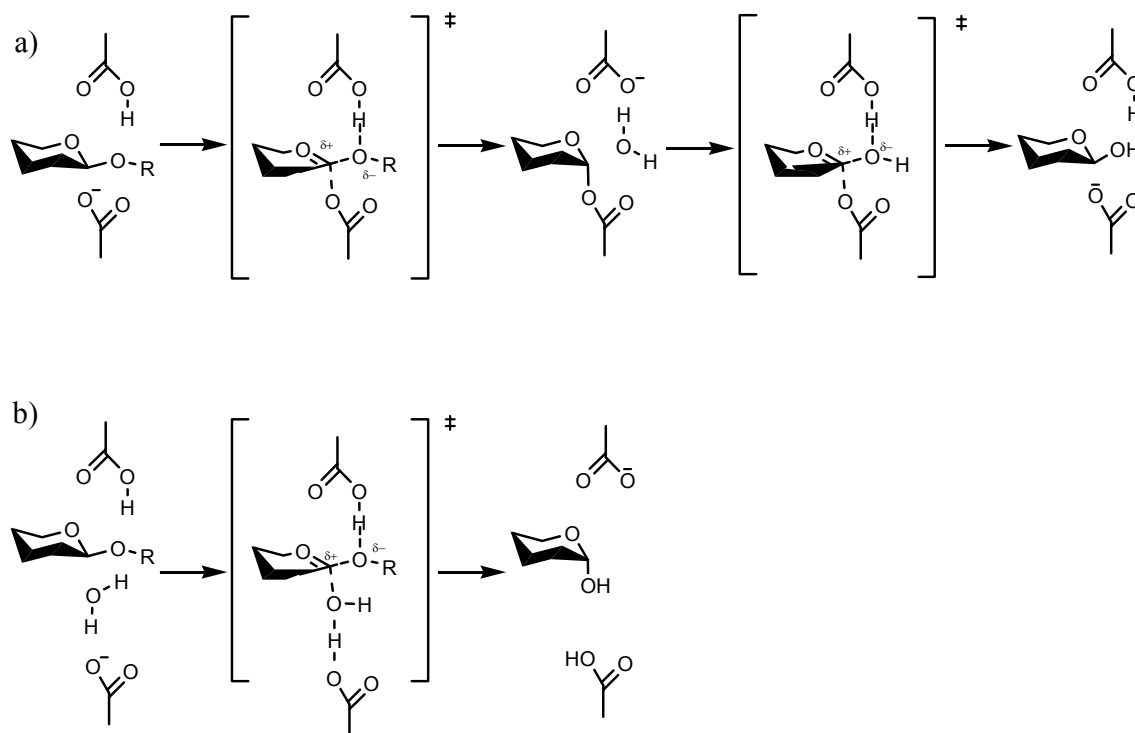


Figura I.3. Mecanisme d'hidròlisi catalitzada de l'enllaç glicosídic. a) Hidròlisi amb retenció de la configuració del carboni anomèric; b) hidròlisi amb inversió de la configuració del carboni anomèric.

Els residus catalítics es determinen combinant mutagènesi dirigida, rescat químic, utilització de substrats suïcides, el coneixement de l'estructura tridimensional i anàlisi de similitud de seqüència.

Els experiments de *mutagènesi* es basen en la substitució dels residus que podrien ser responsables de la catàlisi. Els candidats es busquen entre els aspàrtics o glutàmics conservats dins d'una família. Els residus escollits es substitueixen per residus que no tinguin el grup carboxílic però tinguin similar volum i, així, evitar problemes de plegament dels enzims. Les

²² Un exemple és la mirosinasa (Burmeister *et al* (1997) *Structure* 5, 663-675), enzim que pertany a la família 1 de les glicosilhidrolases, i hidrolitza enllaços S-glicosídics; a la posició del residu àcid/base hi ha una glutamina. Recentment s'ha descrit que al centre actiu hi pot entrar una molècula d'ascorbat (vitamina C) que faria les funcions de catàlisi bàsica augmentant la velocitat enzimàtica (Burmeister *et al* (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 39385-39393).

substitucions que provoquin major pèrdua d'activitat correspondran als principals candidats a ser assignats com a residus catalítics²⁴. En aquests casos, és important que es comprovi el correcte plegament de l'enzim i no ens trobem que la pèrdua d'activitat és deguda a una alteració de l'estructura nativa.

Els experiments de *rescat químic* són un complement dels de mutagènesi per a enzims glucohidrolítics amb retenció de la configuració. La substitució dels possibles residus catalítics es fa, no per residus del mateix volum, sinó pels més petits possibles, alanina sobretot. També en aquest cas és molt important confirmar que el plegament és correcte. L'experiment de rescat químic consisteix en afegir a la barreja de reacció, un agent nucleofílic de petit volum que es pugui introduir dins del centre actiu. Si els residus substituïts són els responsables de la catàlisi, s'observa una recuperació de l'activitat hidrolítica sobre determinats substrats. També es pot analitzar el substrat resultant de la hidròlisi per a determinar quin paper juga el residu substituït (Figura I.4). En el cas que el residu substituït sigui el residu àcid, no es pot activar la molècula d'aigua per hidrolitzar l'intermediari glicosil-enzim, però pot actuar el nucleòfil extern que s'hi queda retingut. Mitjançant tècniques de Ressonància Magnètica Nuclear (RMN) es pot detectar el substrat amb el nucleòfil unit amb la mateixa configuració del carboni anomèric que el substrat original. En el cas que el residu substituït sigui el responsable de la catàlisi nucleofílica, el nucleòfil extern es situa en el seu lloc i ja en el primer pas de la catàlisi es forma l'intermediari glicosil-nucleòfil que surt del centre actiu; també es pot detectar per RMN aquest glicosil-nucleòfil, que presenta una configuració del carboni anomèric inversa a la del substrat²⁵.

Els experiments amb *substrats suïcides* es basen en la utilització d'inhibidors irreversibles que, assemblant-se al substrat, són reconeguts pel centre actiu; tenen però, determinats grups funcionals que reaccionen covalentment amb els residus catalítics de l'enzim. El residu unit a l'inhibidor es determina analitzant els pèptids obtinguts per digestió parcial de l'enzim amb proteases. Inicialment es feien servir derivats dels substrats amb grups epoxi, però s'han obtingut molts resultats erronis²⁶. El tipus d'inhibidor emprat actualment per a la determinació dels residus catalítics és, de fet, un substrat amb l'etapa de desglicosidació molt alentida; tant alentida, que fins i tot es pot observar per cristal·lografia de raigs X. Es tracta de derivats del substrat amb un grup fluoro substituïnt l'hidroxil del carboni adjacent a l'anomèric²⁷. Aquest tipus d'inhibidor només permet determinar el residu catalític amb funció de nucleòfil per a enzims amb retenció de configuració.

²³ Dos exemples són les Quitinases de la família 18 (Brameld *et al* (1998) *J. Mol. Biol.* 280, 913-923) i les hexosaminidases de la família 20 (Williams *et al* (2002) *J Biol Chem.* 277, 40055-65).

²⁴ Per exemple: Juncosa *et al* (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 14530-14535.

²⁵ Exemples de rescat químic són: Wang *et al* (1995) *Biochemistry* 34, 14554-14562, per a la β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis*; MacLeod *et al* (1994) *Biochemistry* 33, 6371-6376, per a la xilanasa de *Cellulomonas fimi*; i Viladot *et al* (1998) *Biochemistry* 37, 11332-11342, per l'endoglucanasa de *Bacillus licheniformis*.

²⁶ En aquesta revisió es citen els problemes que hi ha hagut amb els substrats suïcides basats amb grups epoxi a més de descriure els altres tipus utilitzats: Withers i Aebersold (1995) *Protein Sci.* 4, 361-372.

²⁷ Per a derivats glucòsids, es tracta de 2-fluoro-2-deoxi-glucòsids (Withers *et al* (1990). *JACS* 112, 5887-5889).

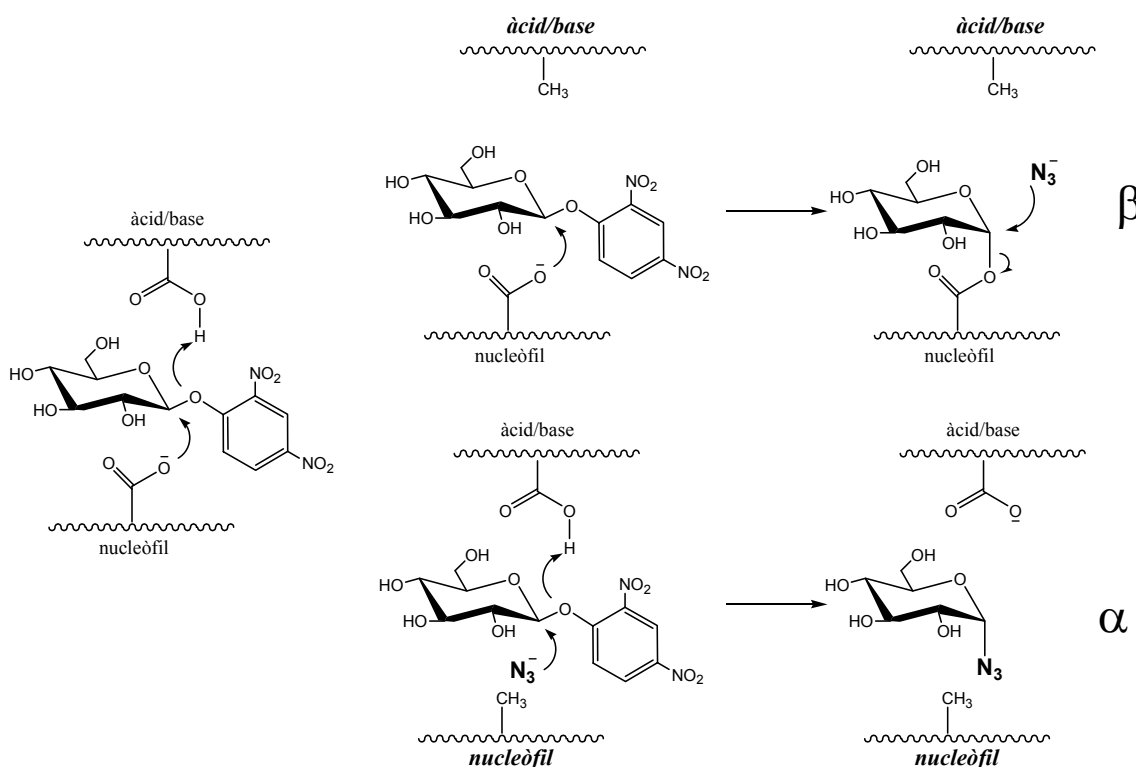


Figura I.4. Metodologia de rescat químic de l'activitat de mutants inactius en posicions catalítiques essencials, per a la identificació dels residus àcid/base general i nucleòfil mitjançant proves funcionals.

L'estudi de l'estructura tridimensional permet confirmar els resultats obtinguts per altres tècniques i, en el cas que encara no s'hagi fet mutagènesi, per restringir el número de possibles residus.

La importància de la combinació d'aquests diferents mètodes es pot exemplificar amb la muraminidasa d'*Streptomyces coelicolor* amb l'estructura tridimensional determinada però sense que s'hagi identificat els residus catalítics²⁸.

A partir de l'estructura tridimensional de les diferents glicosilhidrolases s'ha mesurat la distància que hi ha entre els residus catalítics²⁹: per als enzims que actuen amb retenció de configuració la distància és d'uns 5.5 Å, mentre que per aquests que ho fan amb inversió de configuració la distància és major, uns 9 Å, en haver-s'hi de col·locar una molècula d'aigua entre mig³⁰.

1.5. Característiques del mecanisme catalític de les β-glucosidases de la família 1

Els enzims de la família 1 de les glicosilhidrolases són exoglucosidases i el seu mecanisme de catàlisi és per retenció de la configuració del carboni anomèric. Exceptuant la mirosinasa

²⁸ Rau *et al* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 31994-31999.

²⁹ La distància es mesura entre els oxígens més propers dels grups carboxílics de la cadena lateral dels residus catalítics, ja siguin àcid/base-nucleòfil per als enzims amb retenció de la configuració, o àcid-base per als que l'inverteixen.

³⁰ White i Rose (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 645-651.

que ja s'ha comentat³¹, els residus catalítics d'aquesta família son dos glutàmics que fan les funcions de nucleòfil i d'àcid/base, respectivament. L'estructura dels enzims de la família 1 és un barril de 8 làmines β amb 8 hèlix α intercalades (barril- α/β_8) (Figura I.5). El centre actiu es

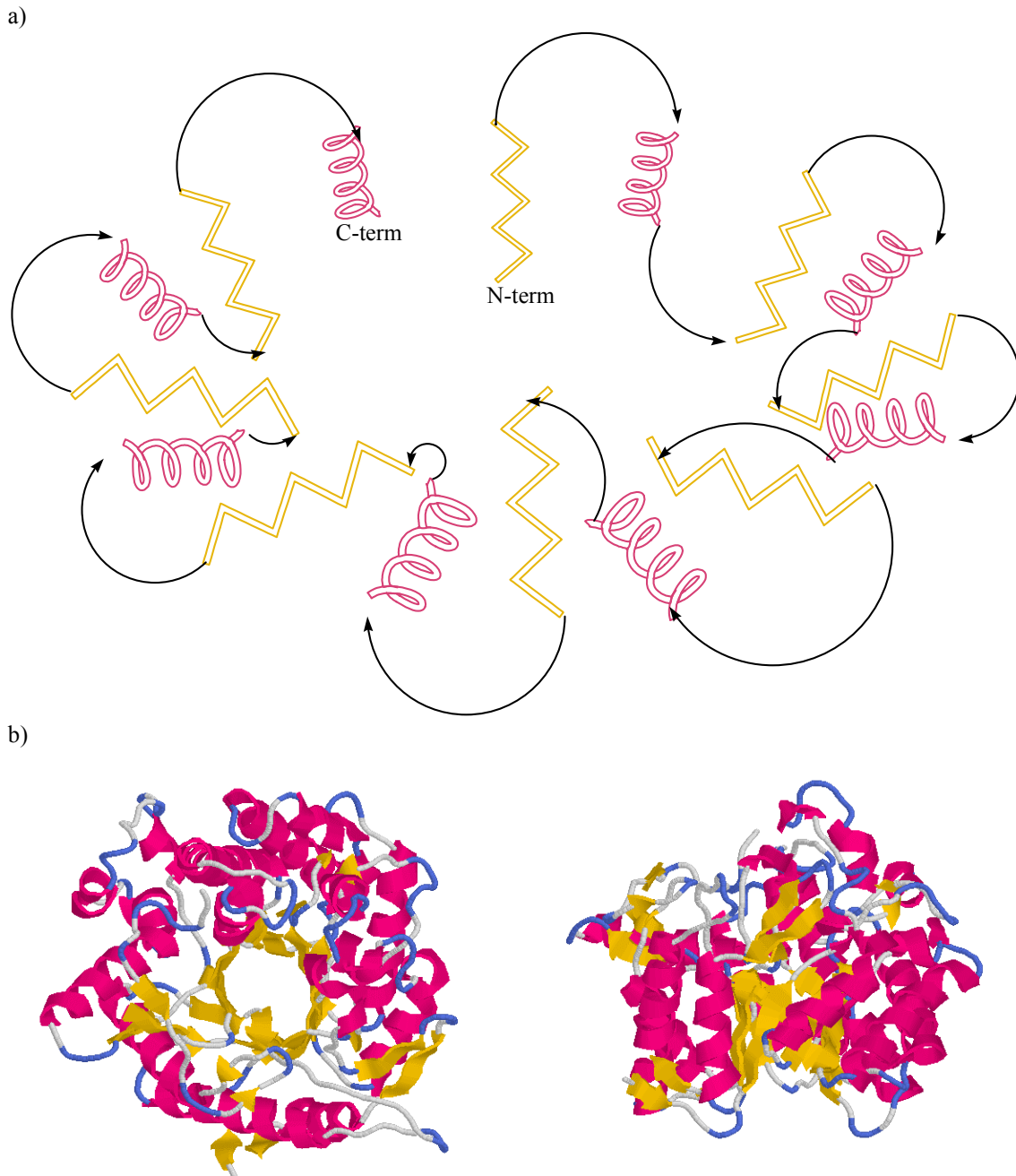


Figura I.5. a) Esquema d'una estructura en barril alfa/beta. b) Representació en cintes de l'estructura tridimensional d'una proteïna amb estructura de barril alfa/beta (β -glucosidasa de *Trifolium repens*, codi PDB 1CBG). Les làmines beta estan en groc i les hèlix alfa en vermell.

³¹ Burmeister *et al* (1997) *Structure* 5, 663-675.

troba enfonsat en el barril a l'interior d'una "butxaca". És situa a l'extrem C-terminal de làmines beta del barril, i la cavitat del centre actiu està formada pels llaços que uneixen l'extrem de les làmines beta i els inicis de les hèlix alfa. D'aquesta manera els residus implicats amb la interacció amb el substrat es troben al final de les làmines beta, o, majoritàriament, al principi dels llaços (beta-alfa); de fet alguns llaços presenten estructures secundàries (hèlix alfa i làmines beta curtes). El substrat entra en el centre actiu amb l'extrem no reductor orientat cap al fons de la butxaca. Els diferents enzims d'aquesta família 1 poden acceptar com a extrem no reductor els monosacàrids β -D-glucosa, β -D-galactosa, 6-fosfo- β -D-glucosa, β -D-mannosa i β -D-fucosa, encara que també accepten altres monosacàrids o derivats³². L'extrem reductor o aglicó pot ser més heterogeni, i fins i tot cada un dels enzims és capaç d'hidrolitzar sucres amb aglicons molt diversos³³. Pel que fa a l'enllaç que hidrolitzen, les β -glucosidases presenten gran especificitat per la configuració β , però poca o baixa estereoespecificitat, de manera que poden hidrolitzar enllaços $\beta 1 \rightarrow 4$, $\beta 1 \rightarrow 3$, o $\beta 1 \rightarrow 2$ amb pràcticament la mateixa eficiència³⁴. La manca d'estereoespecificitat és esperable per la poca especificitat observada respecte a l'aglicó. A la figura I.6 es presenta un dendrograma amb tots els enzims de la família 1 amb les diferents activitats catalítiques.

La reacció d'hidròlisi catalitzada per les β -glucosidases es pot dividir en tres etapes. La primera etapa consisteix en la formació del complex enzim-substrat; és una etapa ràpida en comparació a les altres dues i totalment reversible; no es donen canvis químics al substrat, però probablement l'enzim utilitza l'energia d'unió (es formen ponts d'hidrogen que estableixen el complex) per preparar el següent pas de la catàlisi, és a dir, la formació del complex enzim-substrat provoca que la conformació del sucre passa de l'estructura "en cadira" a una estructura "en gandula" per afavorir l'atac nucleofílic del residu nucleòfil sobre el carboni anomèric. La deformació que pateix el sucre s'explica per a substrats llargs que establint nombroses interaccions amb l'enzim, permeten la generació de les tensions necessàries per a la deformació; però amb substrats petits, com ara disacàrids, l'energia per a produir aquestes tensions és possible que s'obtingui de la vibració natural de les proteïnes: això ho corroboraria el fet que les glucosilhidrolases que actuen sobre substrats petits tenen pesos moleculars més grans i tendeixen a embolcar totalment el substrat.

La següent etapa catalítica consisteix en l'atac nucleofílic sobre el carboni anomèric assistit per catàlisi àcida. Aquesta etapa s'anomena *glicosidació* i té com a resultat la formació d'un intermediari covalent glicosil-enzim i l'alliberament de l'aglicó. El residu que fa la catàlisi àcida

³² Per exemple, la pentosa xilosa o derivats deoxi o deoxi-fluoro.

³³ Aquesta baixa especificitat s'aprofita en els estudis d'activitat enzimàtica per la possibilitat d'usar substrats amb un aglicó l'alliberament del qual es pot seguir colorimètricament.

³⁴ Aquesta flexibilitat no ha estat confirmada per moltes glucosidases (normalment es treballa amb substrats $\beta 1 \rightarrow 4$) i per tant és possible que no sigui una característica general, uns exemples de procariota i de plantes són: la β -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. (ATCC 11238) (Pérez-Pons *et al* (1994) *Eur. J. Biochem.* 223, 557-565) i la d'ordi (Leah *et al* (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 15789-15797). Aquesta mena d'estereoespecificitat s'anomena regioespecificitat.

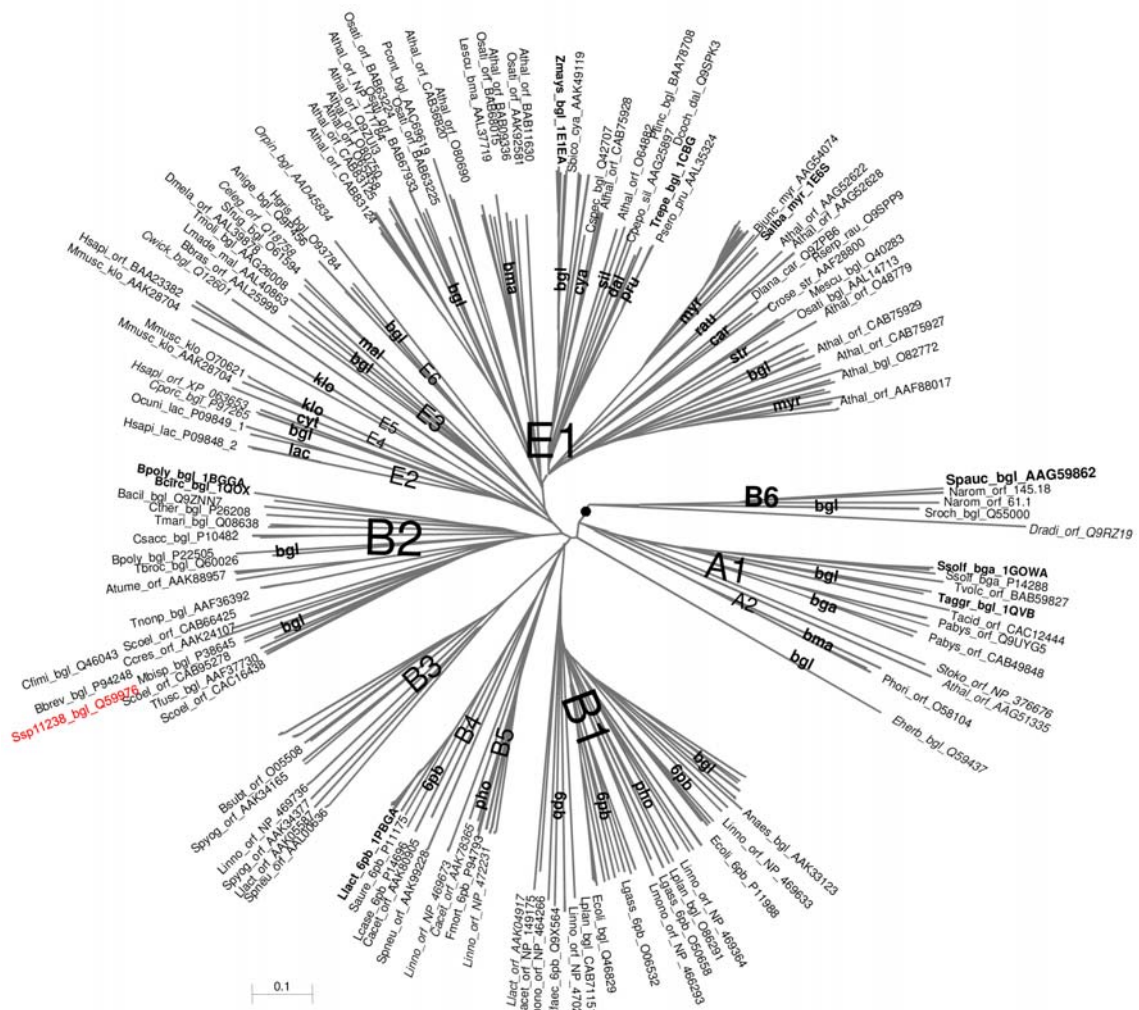


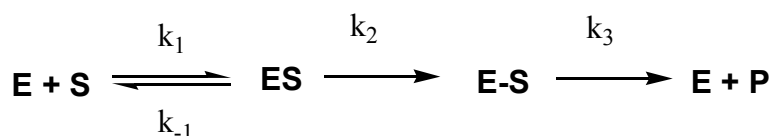
Figura I.6. Arbre filogenètic de les glicosil hidrolases pertanyents a la família 1. Extret de Marques *et al* (2003) *Biochem. J.* 370, 793-804. Construït a partir de totes les seqüències dipositades a la web CAZy al gener del 2002. El punt central de l'arbre està indicat amb un cercle. Les distàncies filogenètiques es poden interpretar amb la llegenda: 0,1 substitucions/posició. Les subfamílies tenen un mínim de 3 seqüències, i s'anomenen amb una lletra que indica el regne (A - Archaea, B - Bacteria, E - Eukarya) i un número correlatiu assignat de major a menor nombre d'espècies presents en cada subfamília. Les seqüències que no es troben classificades en subfamílies tenen la seva identificació en gris i en cursiva. S'indica l'activitat catalítica segons aquest criteri: bga, β -galactosidase (EC 3.2.1.23); bma, β -mannosidasa (EC 3.2.1.25); bgl, cyt i mal, β -glucosidasa (EC 3.2.1.21); car, cardenolide 16-O-glucohidrolasa; dal, dalcochinin (β -glucosidasa/ β -fucosidasa); klo, Klotho proteïna; lac, lactasa-phlorizin hidrolasa (EC 3.2.1.62); cya, cyanogenic β -glucosidasa (EC 3.2.1.21); 6pb, 6-fosfo- β -glucosidasa (EC 3.2.1.86); pho, 6-fosfo- β -galactosidasa (EC 3.2.1.85)/ fosfo- β -cellobiase (EC 3.2.1.-); pru, prunasin β -glucosidasa (EC 3.2.1.118); myr, mirosinasa (EC 3.2.3.1); rau, raucaffricina-O-fosfo- β -glucosidasa (EC 3.2.1.125); sil, *silverleaf whitefly induced protein*; str, trictosidi fosfo- β -dulosidasa (EC 3.2.1.105). Les seqüències s'identifiquen amb el següent criteri: el nom de l'espècie està representat per la primera lletra del gènere seguit per les primeres 4 lletres de la resta del seu nom; hi segueix l'abreviació de tres lletres de l'activitat catalítica; i finalment hi ha un codi que l'identifica (PDB, SwissProt/TrEMBL o GenBank/EMBL).

cedeix un protó a l'oxigen de l'enllaç glicosídic que se'n va amb l'aglicó. El nou enllaç format és una mica més reactiu que el glicosídic, en aquest cas es tracta d'un acetal unit a un grup carboxílic, diferenciant-se només de l'èster per la reactivitat del carboni anomèric que està doblement substituït per oxigen.

La tercera etapa catalítica consistiria en la hidròlisi de l'intermediari glicosil-enzim per atac d'una molècula d'aigua dirigida o activada pel grup carboxílic encarregat de la catàlisi bàsica. Aquesta etapa s'anomena *deglicosidació* i té com a resultat l'alliberació del glicòsid hidrolitzat (concretament la seva part glicona) i l'enzim en el seu estat de protonació inicial.

Tant l'etapa de glicosidació com la de deglicosidació es porten a terme amb estats de transició amb característiques oxocarbocatiòniques³⁵.

En resum, el mecanisme de la reacció d'hidròlisi es pot escriure d'aquesta manera:



Essent els paràmetres cinètics característics³⁶:

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

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

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

Com ja s'ha comentat, en la família 1 el mateix residu actua com a catalitzador àcid/base, éssent tant aquest com el que té la funció de nucleòfil residus amb un àcid carboxílic, generalment glutàmic. Per a què cadascun d'aquests residus amb grup carboxílic es trobi a l'estat de protonació adequat hi ha tot un seguit d'interaccions amb altres residus del centre actiu. Per exemple, al costat del residu que fa de nucleòfil hi ha 3 residus conservats, una tirosina, una asparagina i una arginina, que estableixen ponts d'hidrogen amb ell; a més, l'arginina li permet estar desprotonat per quan entra el substrat (Figura 1.7)³⁷. A l'estructura tridimensional de complexos amb inhibidors s'ha observat que un cop s'ha format l'intermediari

³⁵ Una bona revisió del tema es troba a: Sinnott (1990) *Chem. Rev.* 90, 1171-1202.

³⁶ La k_{cat} és la constant de proporcionalitat entre la concentració de l'enzim i la velocitat màxima de l'enzim (per l'enzim a ple rendiment, o sia per concentracions de substrat que assegurin que tot l'enzim estigui unit a substrat). Les seves unitats són (temps^{-1}), i indica el nombre de molècules de substrat que han reaccionat per molècula d'enzim per unitat de temps. El valor de K_M correspon a la concentració de substrat que fa que l'enzim estigui reaccionant al 50%. Valors més baixos de K_M indiquen una major afinitat de l'enzim pel substrat.

³⁷ Corresponen a les R72, N297 i Y299 de la 6-fosfo- β -galactosidasa de *Lactococcus lactis*, Wiesmann *et al* (1997) *J. Mol. Biol.* 269, 851-860; i la R95 de la glicosidasa de *Sulfolobus sulfataricus*, Burmeister *et al* (1997) *Structure* 5, 663-675. Els equivalents a la Bgl3 d'*Streptomyces* son la R89, N307 i Y309.

glicosil-enzim, l'arginina s'enfonsa i trenca la seva interacció amb el nucleòfil, mentre que paral·lelament es formen noves interaccions sobre l'oxigen de l'enllaç glicosil-enzim³⁸.

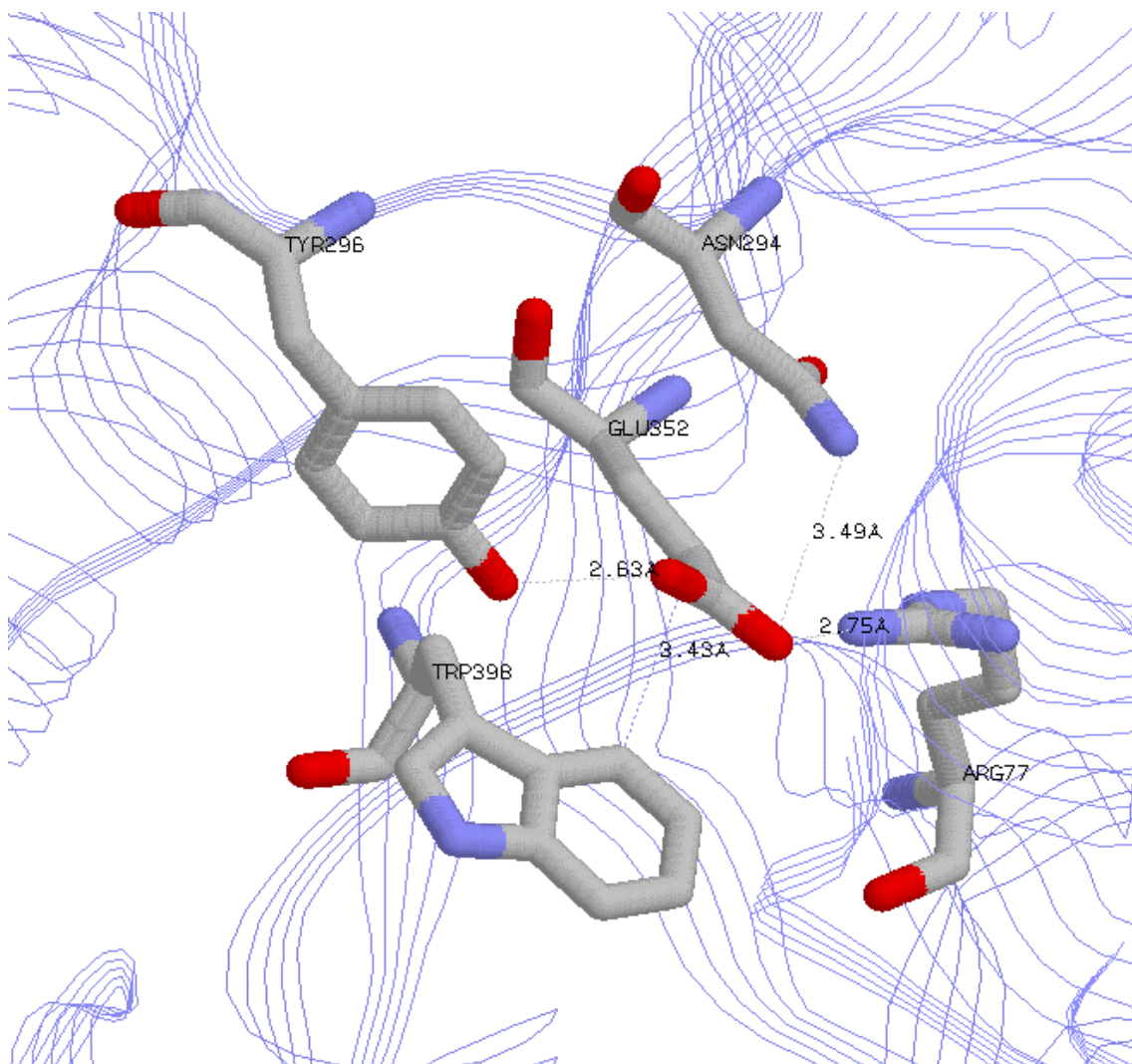


Figura I.7. Estructura de les interaccions sobre el residu catalític nucleòfil (Glu 352) al centre actiu de la β-glucosidasa de *Bacillus polymyxa* (1BGA).

Una manera de determinar l'estat iònic dels residus del centre actiu és obtenir el perfil d'activitat enzimàtica en funció del pH. La relació del pH i l'activitat de l'enzim depèn de l'estat iònic dels residus catalítics, encara que hi ha altres factors com ara l'estabilitat de l'estructura que influeixen en aquesta relació. Si durant l'anàlisi del perfil d'activitat en funció del pH es mantenen constants els altres factors que influeixen sobre les propietats àcid/base de l'enzim³⁹, es podran calcular els valors de pK_a dels residus catalítics. Els pK_a obtinguts a partir de corbes d'activitat respecte al pH s'han contrastat amb experiments de ^{13}C -RMN per a un altre tipus de

³⁸ Burmeister *et al* (1997) *Structure* 5, 663-675.

³⁹ L'activitat de l'enzim respecte el pH depèn de la temperatura, força iònica, tampó emprat i concentració d'enzim; a part dels pK_a dels residus catalítics.

glicosilhidrolasa⁴⁰, obtenint-se resultats similars i per tant validant la tècnica inicial. Un altre tipus d'experiment per a determinar els pK_a dels residus catalítics consisteix en mesurar el pK_a del residu que fa la catàlisi àcid/base general per inactivació, a diferents pH, amb un reactiu que ataca residus àcids en forma protonada; els resultats han coincidit amb el pK_a obtingut a partir dels perfils d'activitat respecte al pH⁴¹.

Una altra manera d'obtenir informació del mecanisme catalític dels enzims és l'*anàlisi de Hammett*⁴². Aquest s'ha utilitzat a les glucosilhidrolases per a determinar l'etapa limitant de la velocitat de reacció i per caracteritzar l'estat de transició oxocarbocatiònic. L'anàlisi de Hammett determina la relació entre una constant de reacció i la naturalesa i disposició dels àtoms units als grups funcionals reactius. A les β -glucosidases de la família 1 es pot dur a terme una anàlisi de Hammett gràcies a la baixa especificitat per la part aglicònica del substrat: es poden utilitzar diferents aril-glucòsids amb diferent configuració electrònica a l'anell aromàtic per correlacionar-los amb la velocitat d'hidròlisi catalitzada per la β -glucosidasa. La relació es representa per la k_{cat} en funció del pK_a dels substituents aromàtics. Tenint en compte que el mecanisme catalític comporta que a la primera etapa catalítica (glicosidació) s'allibera l'aglicó, la dependència de la velocitat de reacció respecte al pK_a del grup sortint indicarà que l'etapa de glicosidació és limitant. També és vàlid el contrari: la independència de la velocitat de reacció respecte al pK_a de l'aglicó indicarà que l'etapa limitant és la de deglicosidació que es produeix independentment de l'aglicó perquè aquest ja no està al centre actiu⁴³. Això també indica que la unió del substrat al centre actiu per formar el complex enzim-substrat és ràpida i no influeix significativament en la velocitat del procés global. Quan més gran és la relació entre l'activitat i el pK_a de l'aglicó més accentuat és l'estat iònic de l'estat de transició. En el cas de trobar-se una relació bifàsica donarà una idea del punt on s'igualen les velocitats de reacció de cada etapa. S'han fet anàlisis de Hammett amb enzims d'altres famílies de glucosilhidrolases obtenint-se resultats específics per a cada família⁴⁴.

1.6. Interaccions no covalents amb el substrat

A l'apartat anterior s'ha explicat com l'enzim catalitza la reacció d'hidròlisi; però a la reacció hi participen altres residus a part dels dos catalítics. Hi ha residus que interaccionen amb els

⁴⁰ McIntosh *et al* (1996) *Biochemistry* 35, 9958-9966.

⁴¹ Malet i Planas (1997) *Biochemistry* 36, 13838-13848.

⁴² Toney i Kirsch (1992) *Protein Science* 1, 107-119.

⁴³ Hi ha la possibilitat que l'etapa limitant sigui la glicosidació i la k_{cat} sigui independent del pK_a : això passa si les diferències entre els aglicons queden del tot neutralitzades per la catàlisi àcida; aquesta corregeix els efectes electrònics intramoleculars dels substituents del benzè eliminant els seus efectes inductius (Ausín (1999) TFC. IQS. Barcelona).

⁴⁴ β -galactosidasa d'*E. coli* (Sinnott i Souchard (1973) *Biochem. J.* 133, 89-98); neuraminidasa del virus de la grip (Guo *et al* (1994) *JACS* 116, 5572-5578); exo- β -1,4-glicanasa de *Cellulomonas fimi* (Tull i Withers (1994) *Biochemistry* 33, 6363-6370); endo- β -1,4-xilanasa de *Bacillus circulans* (Lawson *et al* (1997) *Biochemistry* 36, 2257-2265); i les β -glucosidases d'*Agrobacterium faecalis* (Kempton i Withers (1992) *Biochemistry* 31, 9961-9969, Withers *et al* (1992) *Biochemistry* 31, 9979-9985) i *Pyrococcus furiosus* (Bauer i Kelly (1998) *Biochemistry* 37, 17170-17178).

residus catalítics contribuint al valor de pK_a . Altres residus interaccionen específicament amb parts del substrat amb un doble objectiu: 1) estabilitzar el complex enzim-substrat per facilitar la catàlisi, el que permet discriminar entre substàncies similars al substrat però que no tenen els grups que interaccionen; i 2) ajudar a la deformació del substrat tot aprofitant l'energia d'unió, per fer-ne la seva estructura més semblant a l'estructura de l'estat de transició. Les interaccions que estableixen aquests residus amb el substrat són sobretot ponts d'hidrogen, hi ha també interaccions hidrofòbiques i de van der Waals, i, quan el substrat presenta alguna càrrega, com en el cas de la lactosa-6-fosfat hidrolitzada per la 6-fosfogalactosidasa de *Lactococcus lactis*, es produeixen interaccions iòniques⁴⁵.

Hi ha tres maneres d'estudiar aquestes interaccions no covalents. Una opció és analitzar estructures tridimensionals per difracció de raigs X de cristalls d'enzim amb anàlegs de substrat⁴⁶. Però aquest mètode només proporciona una fotografia del procés de la reacció i les interaccions que es poden observar poden ser temporals i no determinants per a la catàlisi.

Per altra banda es poden analitzar substrats amb algun substituent canviat. Aquest mètode permet determinar amb quins substituents del substrat hi ha interaccions, de quina importància i de quin tipus són⁴⁷. Amb el mateix objectiu també es pot analitzar l'especificitat de substrat dels enzims per diferents sucres naturals.

Paral·lelament es pot analitzar l'activitat d'enzims en els quals s'han substituït determinats residus. Les mutacions es planifiquen a partir de les dades de l'estructura tridimensional del propi enzim o per homologia de seqüència amb altres enzims d'estructura coneguda; així es determinen els aminoàcids que pot ser que estableixin interaccions amb el substrat. Analitzant l'activitat dels enzims mutats es confirmen i s'identifiquen les interaccions previament detectades mitjançant anàlegs de substrat. Amb aquesta metodologia, aplicada a la β -glucosidasa de *Sulfolobus solfataricus*⁴⁸, s'han determinat els residus que estableixen interaccions amb els hidroxils de la meitat no reductora del substrat (subseti -1)⁴⁹. És interessant estudiar l'especificitat de l'enzim al subsetí +1 pel seu paper en recents aplicacions

⁴⁵ Wiesmann *et al* (1995) *Structure* 3, 961-968.

⁴⁶ Anàlegs de substrat com el 2,4-dinitrofenil-2-deoxi-2-fluoro-glicòsid que s'hidrolitza tan lentament que permet veure'l dins del centre actiu en cristalls (la hidròlisi s'atura a l'etapa de la desglicosidació); o inhibidors com tioglucòsids (glucòsids amb sofre en comptes d'oxigen a l'enllaç glicosídic).

⁴⁷ Un exemple és l'estudi fet sobre la Lactasa intestinal humana amb anàlegs de substrat per deshidroxilacions puntuals i substitucions per grups fluoro (Fernández *et al* (1995) *Carbohydr. Res.* 271, 31-42); un treball similar però només sobre l'extrem no reductor s'ha fet sobre la β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* (Namchuk i Withers (1995) *Biochemistry* 34, 16194-16202).

⁴⁸ Corbett *et al* (2001) *FEBS Lett.* 509, 355-360

⁴⁹ Els subsetis corresponen a les parts del centre actiu on s'hi ubica una subunitat monosacàrid del substrat, per conveni es nomena -1 a l'extrem no reductor que conté el carboni anomèric que s'hidrolitzarà per l'enzim i +1 a l'extrem reductor o aglicó unit al monosacàrid anterior (Davies *et al* (1997) *Biochem J.* 321, 557-559).

de les β -glucosidases, com són la síntesi d'oligosacàrids⁵⁰ o la glicosidació inespecífica d'aglicons⁵¹.

1.7. Síntesi enzimàtica de sucres

La biocatàlisi i dintre d'ella la síntesi enzimàtica de sucres s'ha desenvolupat per a substituir la síntesi química estalviant passos i reactius⁵². Els sucres tenen molts grups reactius (bàsicament hidroxils) i molt semblants (hi ha poques diferències entre la reactivitat per cada un d'ells), i això obliga a realitzar molts passos de protecció i desprotecció encarint i limitant els rendiments de reacció. Per altra banda, els enzims ofereixen regioespecificitat⁵³ i cada cop es van desenvolupant més tècniques que augmenten el rendiment de les reaccions. Es fan servir dos tipus d'enzims: glicosiltransferases i glicosidases. Les *glicosiltransferases* formen part de la maquinària cel·lular encarregada de la síntesi d'oligo i polisacàrids i requereixen sucres activats amb un cofactor (majoritàriament, un nucleòtid). Sintetitzar in vitro substrats activats és complex i obtenir i conservar aquests enzims, molt làbils, no resulta ara per ara econòmic. Per contra, les *glicosidases* són enzims més estables i s'aprofita el fet que a la reacció d'hidròlisi es pot afegir un sucre en lloc de la molècula d'aigua catalítica; aquest sucre acaba incorporant-se o unint-se a la meitat glicona en una reacció anomenada de transglicosidació (Figura 1.8.a)⁵⁴. Per a facilitar la reacció de transglicosidació es redueix l'activitat de l'aigua amb dissolvents orgànics i s'augmenta la concentració de l'alcohol que fa d'acceptor. Però tot i així els rendiments no són molt elevats, i per aquest motiu s'utilitza l'estratègia de fer servir un donador activat (per exemple, amb un bon grup sortint com a aglicó): es facilita, doncs, la primera etapa del mecanisme catalític (glicosidació) i per tant s'augmenta la concentració de l'intermediari glicosil-enzim on s'ha d'incorporar l'acceptor (Figura 1.8.b). Amb aquesta estratègia la síntesi té rendiments superiors, però encara està limitada per l'elevada hidròlisi del donador i la hidròlisi dels productes de síntesi. Una estratègia recent és la de fer servir substrats activats i enzims amb el nucleòfil substituït⁵⁵. Aquests enzims s'anomenen *glicosintases*, són inactius en termes

⁵⁰ Es pot trobar una revisió de les aplicacions de síntesi d'oligosacàrids en aquests dos treballs: Conti (2001) TFC. IQS. Barcelona; Saura (2001) TFC. IQS. Barcelona.

⁵¹ Un exemple d'aplicació de derivats glicosídics és la morfina-6- β -glucuronid que té propietats més analgèsiques que la morfina (Paul *et al* (1989) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251, 477-483; Frances *et al* (1992) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262, 25-31).

⁵² Toone *et al* (1989) *Tetrahedron* 45, 5365-5422. Aquesta revisió és una mica antiga però explica les dificultats en la síntesi química de sucres. I cita molts treballs de síntesi enzimàtica de sucres.

⁵³ Com ja s'ha dit, regioespecificitat és l'especificitat sobre la posició on està l'enllaç glicosídic (1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 3,...). També s'ha comentat que els enzims de la família 1, no presenten molta regioespecificitat, però això és respecte a la reacció d'hidròlisi; en canvi respecte a la transglicosidació tendeixen a presentar força regioespecificitat. S'entén com a acceptor la molècula amb un grup alcohol (OH), que s'uneix per enllaç glicosídic al carboni anomèric del sucre (que s'anomena *donador*).

⁵⁴ La transglicosidació per unió d'un acceptor diferent de l'aigua a l'intermediari glicosil-enzim dona lloc a un sucre prèvia hidròlisi d'un altre; una altra estratègia és afegir al medi de reacció només els productes de la reacció i deixar que es realitzi la reacció inversa, però aquest mètode no s'utilitza per la seva baixa eficiència.

⁵⁵ La substitució es fa per mutagènesi dirigida sobre el gen i es canvia per alanina o serina. El primer treball que fa servir aquesta tècnica és Mackenzie *et al* (1998) *JACS* 120, 5583-5584.

hidrolítics però catalitzen la incorporació d'un acceptor al donador activat amb elevada eficiència. El donador activat és un sucre amb el carboni anomèric deoxifluorat⁵⁶; la configuració del carboni anomèric respecte a aquest substituent és la contrària a l'específic de l'enzim, simulant-se d'aquesta manera l'intermediari glicosil-enzim. L'acceptor és un sucre o algun derivat i l'enzim s'encarrega de dirigir-lo en la orientació de mínima energia, resultant en una regioespecificitat en els productes de transglicosidació. L'acceptor també podria ser una molècula d'aigua i per tant s'hidrolitzaria el donador reduint l'eficiència de síntesi; encara que en els treballs publicats no s'observa una hidròlisi significativa del donador activat, pot ser que sigui un factor limitant per a estendre's a la resta de les glicosilhidrolases. El mecanisme catalític de la glicosintasa està esquematitzat a la figura I.8.c.

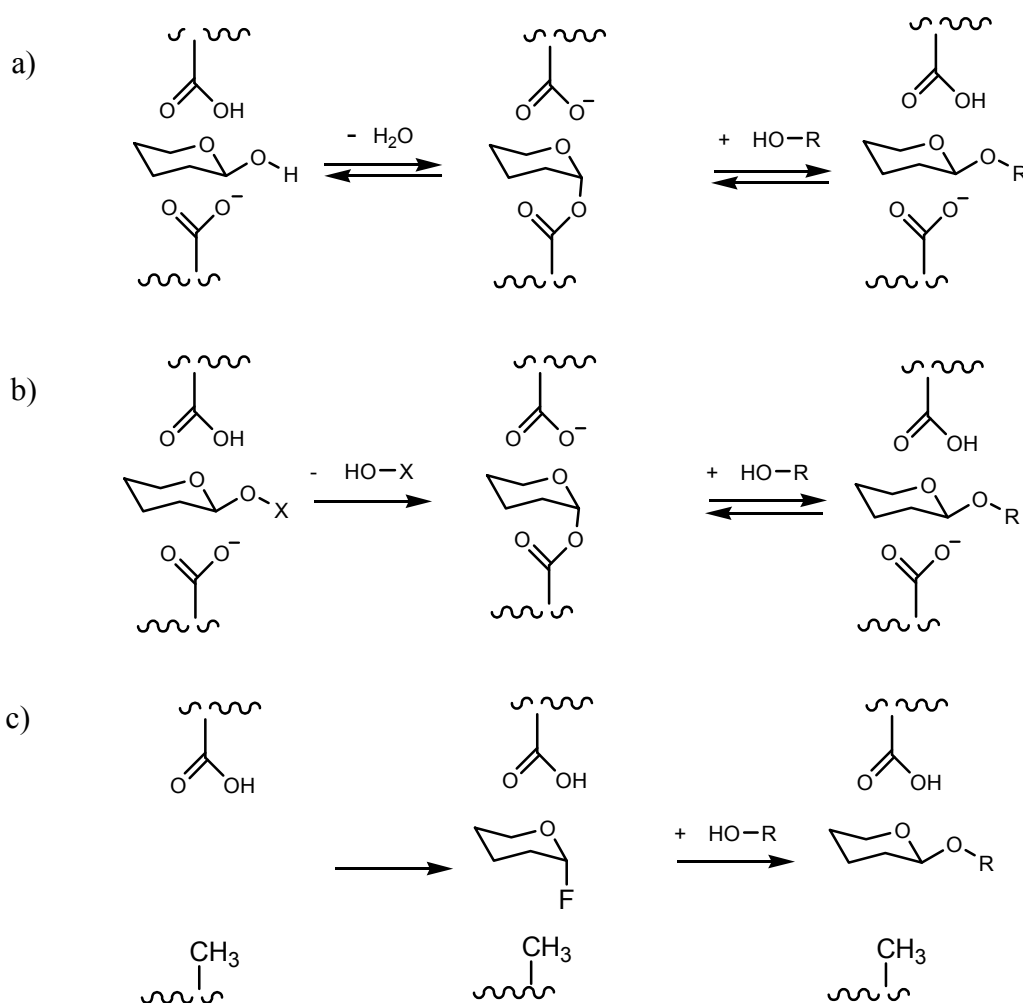


Figura I.8. Mecanismes de síntesi enzimàtica de sucres. a) transglicosidació cinètica, és a dir, invertint la reacció d'hidròlisi; b) transglicosidació termodinàmica afavorint amb un substrat molt reactiu la concentració d'intermediari glicosil enzim, l'intermediari es pot hidrolitzar; les glicosiltransferases que actuen amb retenció de la configuració fan servir aquesta mena de mecanisme essent la molècula activadora (X) majoritàriament un nucleòtid o un fosfat; c) transglicosidació mitjançant glicosintasa.

⁵⁶ L'obtenció de donadors glicosil-fluorurs es realitza en tan sols dos passos: el sucre prèviament acetilat

Els estudis d'interaccions del centre actiu amb el substrat permetran generar una base de dades d'especificitat. La caracterització de l'especificitat de substrat, tant en hidròlisi com sobretot en transglicosidació, pot tenir futures aplicacions. Tot i que l'especificitat d'hidròlisi no està directament relacionada amb l'especificitat de síntesi (per transglicosidació mitjançant glicosintasa), aquestes dades representen una informació orientativa que pot resultar molt útil.

1.8. Aplicacions industrials de les glicosidases

Els enzims glicohidrolítics en general es fan servir en gran quantitat a diferents tipus d'indústries. De fet el primer enzim identificat com a tal al 1833, va ser l'amilasa, definida com la substància termolàbil que convertia el midó en sucre en precipitats d'extractes de malta⁵⁷. Però fins al 1914 amb la quimosina per quallar la llet no comença la utilització industrial d'enzims. La primera utilització de glicohidrolases a la indústria (concretament pectinases per eliminar terbolesa als sucres de fruita) està datada al 1930. El salt qualitatiu per a l'aplicació de les glicohidrolases es va produir gràcies a la revolució cubana (1959): a la dècada dels 60 la indústria de begudes dolces americanes va substituir el sucre de canya a base d'hidrolitzar mitjançant α -amilases i glucoamilases, el midó de blat de moro. Amb aquests enzims la indústria del midó es va convertir en la primera indústria alimentària que feia servir enzims a gran escala; i la segona en utilitzar enzims després de l'indústria dels detergents (sobretot proteases en aquest cas). Actualment, les glucohidrolases també s'inclouen en la composició dels detergents. En concret, s'afegeixen cel·lulases per a donar més brillantor i suavitat a la roba eliminant les microfibril·les que es van desprendre, i amilases per treure taques basades en midó (xocolata, salses, i taques de carbohidrats comuns com patata, pasta, o farinetes).

Pel que fa a la indústria de l'alimentació, a banda de la ja esmentada producció de glucosa a partir de midó, es fan servir glicohidrolases en la producció de sucres de fruita, cervesa i vi, i per millorar la qualitat de la farina per pa i pastissos. Per exemple s'utilitzen pectinases per millorar l'obtenció del suc a partir de la fruita i eliminar-ne terboleses. Els productes de les pectinases són oligosacàrids que poden provocar problemes intestinals⁵⁸ i per aquest motiu a vegades s'afegeixen β -glucosidases que acaben hidrolitzant aquests sucres. A la indústria vinícola, l'addició de pectinases augmenta la quantitat de sucres fermentables i així el grau alcohòlic final. A la indústria de la cervesa les glucanases han solucionat molts problemes tècnics (filtració bàsicament) que sorgeixen amb l'augment de l'escala de producció. En la fermentació del gra s'afegeixen amilases i així es redueix temps i es controla millor el procés natural.

També es fan servir glicohidrolases a la producció de pinsos per gallines i porcs. Quan es fan servir cereals més barats, com la civada, però amb contingut de fibra més elevat els animals tenen problemes intestinals i a més els excrements contenen més nutrients i per tant

es fa reaccionar amb àcid fluorhídric en presència d'un catalitzador (piridina); finalment es desprotegeix per reacció amb metòxid sòdic en metanol (Saura (2001) TFC. IQS. Barcelona).

⁵⁷ Leisola *et al*, *Industrial use of enzymes*, <http://www.w3.org/TR/REC-html40>, 2001.

s'incrementen els problemes de la gestió de purins i femtes. En el cas de les gallines el problema s'agreuja perquè els excrements retenen més aigua i els ous en queden coberts. Per a resoldre això es tracten aquests cereals amb β -glucanases i xilanases de manera que es redueix en presència de fibres i per tant la quantitat de femta, augmenta la quantitat de nutrients assimilables.

La indústria de la cel·lulosa (paper) aprofita les propietats de les glicohidrolases en diversos processos⁵⁹. Durant l'obtenció de la pasta verge s'utilitzen xilanases per a netejar les fibres de cel·lulosa de restes de lignina, resultant en aquest cas en un estalvi important de blanquejadors químics d'elevat impacte ambiental. Pel blanqueig de la pasta de paper reciclada es fan servir cel·lulases que separen les tintes de les fibres. A més, a la fabricació de paper i per a millorar la seva resistència, sovint es fa servir midó com a additiu i controlant-se aquest procés mitjançant amilases.

La indústria tèxtil fa servir amilases i cel·lulases⁶⁰. Les primeres s'aprofiten per eliminar una cola protectora de base midó afegida en el procés de producció. Les cel·lulases s'han introduït per substituir el rentat a la pedra de la roba texana obtenint-se els mateixos resultats, però sense fer malbé la maquinària.

Altres aplicacions de les glicosilhidrolases, però ja de menor importància, es poden trobar, per exemple, com additiu en pastes dentífriques (glucoamilasa)⁶¹, o com a components de *kits* analítics (per exemple kits que determinen estructures glicosilades).

L'ús d'enzims a l'indústria permet, en general, substituir processos o millorar propietats del producte tractat. Normalment el procés substituït resulta més car que l'obtenció del propi enzim emprat, de manera que el resultat és l'abaratiment del procés en comptes d'un sobrecost. A aquest estalvi econòmic s'hi afegeix l'estalvi ecològic derivat de la substitució de molts reactius químics. A la taula 1.2 es mostra el volum econòmic de les glicohidrolases l'any 2000 a diferents tipus d'indústria.

Per acabar s'esmenta una aplicació fallida de les glucosilhidrolases. Durant molts anys s'ha treballat amb la possibilitat d'usar enzims cel·lulohidrolítics per l'obtenció de glucosa a partir de residus rics amb fibres de cel·lulosa. La glucosa així obtinguda representa la matèria primera per a, entre altres, l'obtenció de compostos orgànics (butanodiol, alcohols,...) amb aplicació industrial. El procés enzimàtic no és rentable, de manera que l'aprofitament d'aquesta mena de residus s'aconsegueix amb bateries més completes d'enzims com són els microorganismes.

Val a dir que el coneixement detallat dels mecanismes moleculars de la catàlisi permet a priori establir bases per a la millora de les propietats "útils" dels enzims.

⁵⁸ La indústria farmacèutica utilitza el disacàrid lactulosa (galactosa- β -1-4-fructosa), com a laxant; perquè és indigerible i provoca acumulació de líquids a l'intestí.

⁵⁹ Viikari *et al* (1998) Bruce i Palfreyman, Ed. London.

⁶⁰ Tenkanen *et al* (1999) *Industrial Horizons*, 6–8.

⁶¹ La glucoamilasa s'afegeix en combinació a glucosa-oxidasa que converteixen oligosacàrids derivats del midó, primer en glucosa i després en aigua oxigenada i àcid gluconic, ambdós bactericides.

Taula I.2. Mercat mundial de les glicosilhidrolases.

Aplicació industrial	Tipus d'enzim	Volum de vendes (Milions d'Euros)
Obtenció sucres del midó	amilases i glucoamilases	400
Tèxtil	cel·lulases	70
Pinsos	xilanases i β -glucanases	60
Cervesa	β -glucanases i cel·lulases	40
Suc de fruita	pectinases	30
Detergents	cel·lulases	10
Paper	xilanases	5
Total (any 2000)		615

1.9. La β -glucosidasa d'*Streptomyces*

El gen *bgl3* de la β -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. (ATCC 11238) es va clonar per complementació funcional d'un mutant β -glucosidasa negatiu d'*Streptomyces lividans* i selecció per assaig d'activitat sobre placa⁶². Per seqüenciació es va trobar un ORF de 1440 nucleòtids (74% G+C) que codificava un polipèptid de 479 aminoàcids amb una massa molecular deduïda de 52,3 kDa (codi Z29625). Per similitud de seqüència, la proteïna es va classificar dins de la família 1 de glicosilhidrolases. L'enzim clonat es va purificar a partir d'extractes cel·lulars per precipitació amb sulfat amònic seguida de dues etapes cromatogràfiques en columnes de bescanvi aniónic, obtenint-se una proteïna de 52,6 kDa per espectrometria de masses, 54 kDa per gel filtració (indicaria que l'enzim és monomèric) i amb un pI de 4,4. La caracterització enzimàtica inicial va mostrar que la β -glucosidasa Bgl3 presentava activitat sobre diferents aril-glicòsids i disacàrids així com sobre cel·luloligòmers que eren hidrolitzats d'acord a un patró d'actuació de tipus exo, és a dir, alliberant residus de glucosa a partir de l'extrem no reductor del substrat. Els valors òptims de pH i de temperatura per a l'activitat van ser de 6,5 i 50 °C, respectivament. L'enzim era inhibït per gluconolactona i p-cloromercuribenzoat; les cinètiques amb pNPG (aril-glicòsid) mostraven una clara inhibició per excés de substrat que no s'observava amb cel·lobiosa (disacàrid). De la mateixa soca, *Streptomyces* sp., es van aïllar a més altres dues β -glucosidases, de les quals se'n va caracteritzar una⁶³. Recentment, s'ha seqüenciat el genoma sencer d'una espècie propera, *Streptomyces coelicolor* i s'han trobat sis β -glucosidases diferents, una de les quals és gairebé idèntica a la Bgl3 clonada⁶⁴.

L'enzim purificat presentava també activitat transglicosidasa en presència d'elevades concentracions de substrat o d'un acceptor glucídic⁶⁵. Aquesta propietat va ser caracteritzada, en col·laboració amb el Dr. Cañada (CSIC, Madrid), i comparada amb altres glucosidases de la

⁶² Pérez-Pons *et al* (1994) *Eur. J. Biochem.* 223, 557-565.

⁶³ Pérez-Pons *et al* (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1251, 145-153.

⁶⁴ Les dues β -glucosidases presenten un 89% d'identitat, i un 72% d'identitat amb el gen. Redenbach *et al* (1996) *Mol. Microbiol.* 21, 77-96.

⁶⁵ Pérez-Pons *et al* (1994) *Eur. J. Biochem.* 223, 557-565.

família 1 mostrant una elevada eficiència sintètica amb formació majoritària d'enllaços $\beta 1 \rightarrow 3$ ⁶⁶. Posteriorment, el grup del Dr. Planas (IQS, Barcelona) utilitzant el mutant Bgl3-E383A com a glicosintasa i diferents donadors α -fluorats, han aprofundit en l'estudi de les capacitats sintètiques obtenint interessants resultats que es comentaran a l'apartat "Discussió" del present treball.

⁶⁶ Montero (1998) Universidad Complutense de Madrid.

I.10. Objectius

L'objectiu general d'aquesta tesi s'engloba dins de la línia d'investigació del grup de Biologia Molecular de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (UAB) en enginyeria de glucohidrolases, amb la finalitat d'estudiar la relació estructura/funció en aquestes proteïnes i, en el seu cas, establir possibles bases pel redisseny de la seva activitat o la millora de les seves característiques.

Més concretament, la proteïna estudiada va ser la β -glucosidasa Bgl3 (codi Z29625) de *Streptomyces* sp. QM-B814 (ATCC 11238). Com a objectius específics estan:

1) **Disseny i posada a punt de protocols per a l'obtenció de proteïna i per a la introducció de mutacions puntuals en el gen;** aquests protocols proporcionarien la base metodològica a aplicar de forma rutinària durant el treball i, en aquest sentit, era convenient optimitzar-los, especialment en termes de rendiment i simplicitat operativa.

2) **Identificació dels residus catalítics essencials i assignació del seu paper funcional** d'acord amb el mecanisme proposat per aquests enzims.

3) **Caracterització cinètica acurada de l'enzim**, per aprofundir en l'estudi del mecanisme catalític a nivell molecular.

4) **Estudi del possible paper funcional del residu Cys-181**, situat al centre actiu i relativament ben conservat entre diferents membres de la família 1 de glicosilhidrolases.

5) **Obtenció de cristalls i resolució de l'estructura tridimensional** per difracció de raigs X; aquest objectiu s'ha realitzat en col·laboració amb la Dra. A. Guasch del laboratori del Dr. M. Coll del Centre d'Investigació i Desenvolupament (CSIC, Barcelona).