

III. DISCUSSIÓ

III. DISCUSSIÓ

III.1. Obtenció de l'enzim

Inicialment l'enzim Bgl3 es purificava a partir d'extractes crus d'una soca mutant β -glucosidasa negativa de *Streptomyces lividans* transformada amb un plasmidi recombinant que contenia el gen *bgl3* amb el seu propi promotor¹. El procés de purificació a petita escala incloïa dues cromatografies de bescanvi aniònic que van passar a sis etapes cromatogràfiques quan es va partir de cultius en fermentador a "gran" escala (15-20 L), necessaris per obtenir suficient quantitat de proteïna pura, p. e. per a les proves de cristal·lització. Val a dir que els cristalls obtinguts amb aquest sistema de producció van presentar una difracció molt pobre, probablement degut a la seva petita mida. En qualsevol cas, tant per a l'obtenció de cristalls com davant la perspectiva d'habers d'analitzar al llarg del treball diverses formes mutants de proteïna, el sistema d'expressió/purificació a partir de *Streptomyces* no resultava pràctic ja que consumia molt de temps i donava rendiments molt baixos (uns 70 mg per 15 L de cultiu). Per aquest motiu, el present treball es va endegar amb una sèrie d'intents per expressar la Bgl3 en *E. coli*, alhora que la purificació posterior resultés més simple.

Així, l'expressió heteròloga en *E. coli* es va plantejar inicialment amb l'objectiu d'expressar la proteïna extracel·lularment per facilitar-ne la purificació. Es van fer proves fusionant el gen *bgl3* amb diferents pèptids senyal d'*E. coli* (*pelB*, *ompA*) i de *Bacillus licheniformis* i amb diferents vectors (pUC118, pBR322, pET22). Els resultats van ser negatius, observant-se lisi cel·lular com a conseqüència de la inducció de l'expressió, i inestabilitat plasmídica en sistemes amb menys regulació gènica². Després el gen *bgl3* es va posar sota control de l'operó *lac* per a expressió intracel·lular, obtenint-se rendiments de producció molt elevats. Finalment es va fusionar una cua N-terminal de sis histidines que permet la purificació de l'enzim en una sola etapa cromatogràfica, millorant-se l'expressió amb el vector pET21d (Novagen) que permet l'expressió del gen sota control del promotor de la RNA polimerasa del fag T7 i l'operador *lac*. L'expressió resultant amb aquest sistema ha estat tant elevada que cultius no induïts amb IPTG rendeixen nivells de proteïna similars als cultius induïts, podent-se estimar que prop de la meitat de l'enzim es troba en forma insoluble en cossos d'inclusió. El percentatge elevat de G+C al gen no ha resultat, doncs, cap impediment per a l'expressió elevada d'aquest enzim en *E. coli*. En resum, el clonatge i sobreexpressió de Bgl3 en *E. coli* utilitzant el sistema vector pET i la fusió de la cua-His va permetre amb rendiments de l'ordre de 100-200 mg/L cultiu millorar la disponibilitat de proteïna i reduir-ne la seva purificació a una sola etapa (cromatografia d'afinitat).

¹ Pérez-Pons (1991) UAB. Barcelona.

² Vallmitjana (1995) UAB. Barcelona.

Per a poder obtenir cristalls de la proteïna Bgl3 encara va caldre afegir dues modificacions al protocol d'obtenció de l'enzim: Es va comprovar que si s'obtenia la fracció intracel·lular per sonicació la mostra no cristal·litzava i, per tant, es va substituir aquest pas per la lisi amb lisozim i detergent no iònic; probablement, amb la sonicació es solubilitzava una part de l'enzim precipitat en cossos d'inclusió, generant una mostra heterogènia d'enzim natiu i enzim mal plegat. Finalment, una de les diferents proves realitzades per a l'obtenció de cristalls va ser tractar amb tripsina la proteïna purificada. La proteòlisi limitada amb tripsina elimina la cua N-terminal de l'enzim i un llaç intern de manera que la mostra analitzada per SDS-PAGE dona dos polipèptids de 35 i 17 kDa mentre que per gel filtració elueix com un sol pic que a més conserva l'activitat β -glucosidasa. Així, doncs, el tractament amb tripsina donava lloc a una forma estable i funcional d'enzim i, el que és més important, va permetre obtenir cristalls útils pels estudis encaminats a determinar l'estructura tridimensional de la proteïna (veure apartat II.1). S'ha fet un estudi funcional i estructural de la forma tripsinitzada i s'ha comprovat que la pèrdua d'aquest llaç no altera les propietats de termoresistència ni de desnaturalització per urea³.

III.2. Mutagènesi dirigida

Des del punt de vista metodològic, l'altre vessant que convenia estandaritzar era la introducció puntual de mutacions per a l'obtenció de les diferents isoformes de Bgl3. Les mutacions s'han introduït mitjançant dues tècniques diferents: per PCR i per *cassette* o substitució amb DNA sintètic de la seqüència a mutar.

Mutagènesi dirigida per PCR. S'ha utilitzat una tècnica desenvolupada en el propi grup⁴ consistent en realitzar dues tandes de PCR de manera que el producte de la primera PCR es fa servir com a un dels oligonucleòtids iniciadors de la segona. La primera PCR es fa amb un oligonucleòtid que incorpora la mutació i un altre auxiliar que permet incloure a la zona amplificada una diana de restricció per al clonatge posterior. A la segona reacció de PCR es fa servir també un oligonucleòtid auxiliar que permet incloure l'altra diana de restricció necessària. La "gràcia" de la tècnica consisteix en què el producte de la segona PCR sigui el gen sencer amb la mutació puntual incorporada en el lloc desitjat. Aquesta tècnica s'ha fet servir per a l'obtenció dels mutants a les posicions E178, E383 i R89, i pel mutant C181A. L'elevat contingut en G+C del gen ha dificultat, però, aquest procés i ha calgut posar a punt per a cada mutant les condicions de les dues reaccions de PCR. No ha estat possible l'amplificació del gen sencer i s'ha treballat amb fragments d'aquest prèviament subclonats.

Mutagènesi dirigida per cassette. De resultes de la dificultat de cada PCR i davant la perspectiva d'haber de substituir un mateix residu per diferents aminoàcids (estudi del paper funcional de la Cys181), es va considerar oportú dissenyar un sistema de mutagènesi per

³ Planell (2001) UAB. Barcelona.

⁴ Juncosa *et al* (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 14530-14535.

cassette. Aquest va consistir en inserir a la zona desitjada (al voltant del residu C181) unes dianes de restricció úniques o que permetin subclonar un fragment amb la mateixa seqüència substituïda amb excepció del codó corresponent al residu mutat. Aquest fragment mutagènic inserit es sintetitza *in vitro* en forma de dues monocadenes que hibriden entre si a la mateixa reacció de ligació. Les dianes de restricció inserides generen mutacions silencioses, és a dir, que no alteren la seqüència d'aminoàcids. La inserció d'aquestes dianes properes entre elles es va fer també amb el mètode del *cassette* però utilitzant dianes ja existents (massa separades entre elles per aprofitar-les per a la resta de la mutagènesi). La tria de les dianes existents i de les mutacions silencioses per a la inserció de les noves dianes es va fer mitjançant el programa *SilMut*⁵ desenvolupat en el nostre laboratori. Aquesta aplicació genera un arxiu amb les dianes de restricció existents i les que es poden inserir per mutagènesi silenciosa (veure la figura III.1). El fet que les dianes triades no fossin úniques al plasmidi va obligar a fer una ligació direccional amb 2 dianes més (per al primer *cassette*) i amb 1 diana més per al següent pas; no obstant això, s'ha pogut comprovar empíricament que ligacions direccionals amb 4 fragments (un d'ells, un parell d'oligonucleòtids) rendeixen els plasmidis desitjats.

Tots els mutants van ser comprovats per seqüenciació. Les condicions de la seqüenciació van ser les estàndards per a DNAs rics en G+C i inclouen com a pas inicial la linealització del plasmidi; aquest pas ha resultat ser decisiu per a l'obtenció de seqüències bones, probablement perquè es facilita la desnaturalització del DNA motlle.

III.3. Els residus catalítics essencials

El mecanisme catalític de les glicosilhidrolases de la família 1 consisteix en un doble desplaçament, amb la formació d'un intermediari covalent glicosil-enzim. Per a això, cal esperar dos residus carboxilats com a responsables: un carboxilat amb càrrega actua com a nucleòfil i l'altre, protonat a la primera etapa de la catàlisi, actua com a àcid/base general. La formació de l'intermediari covalent enzim-substrat es faria per atac del nucleòfil sobre el carboni anomèric (etapa de glicosidació) i la posterior formació d'un nou extrem reductor per atac sobre el carboni anomèric d'una molècula d'aigua, la nucleofilia de la qual està augmentada per la base conjugada de l'àcid general (etapa de desglicosidació) (veure la figura I.3.a).

Els residus catalítics de la Bgl3 són el glutàmic 383 (nucleòfil) i el glutàmic 178 (àcid/base general). Hi ha pocs glutàmics o aspàrtics conservats entre tots els membres de la família 1, i en base a aquest fet, es va identificar el residu catalític que fa de nucleòfil tan aviat com a les bases de dades es van acumular prou seqüències⁶. Però la determinació del residu que fa la catàlisi àcid/base va trigar més perquè, com ja s'ha comentat, hi ha enzims com la mirosinasa que no el tenen. La determinació de la primera estructura tridimensional d'un enzim de la família 1 va ser determinant per a l'assignació d'aquest residu. La comprovació experimental

⁵ Cedano (2000).

⁶ Withers *et al* (1990) JACS 112, 5887-5889.

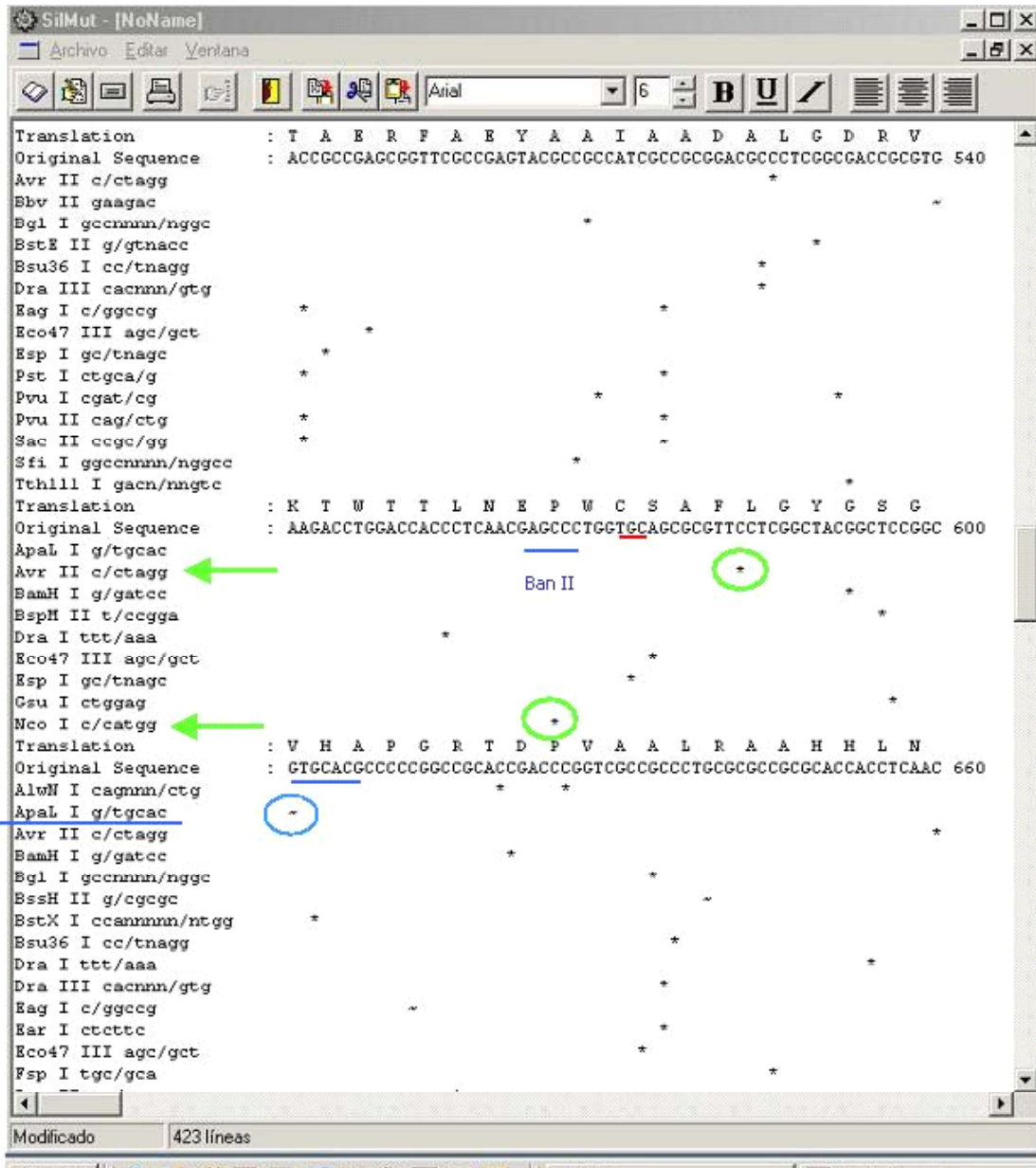


Figura III.1. Finestra del programa SilMut. Fragment de la seqüència de la Bgl3 amb el codó de la C181 subratllat en vermell. Les mutacions silencioses inserides estan marcades en verd. Les dianes existents estan marcades en blau; la diana *Ban II* (GRGCY↓C) no surt en aquesta finestra perquè s'ha restringit a seqüències de més de 5 nucleòtids. En el resultat proporcionat pel programa, l'asterisc indica una possible diana per mutació silenciosa i el símbol “~” indica diana ja existent.

del paper d'aquests residus a la catàlisi, s'ha realitzat tan sols en 2 representats de la família a banda del que es presenta en aquest treball⁷. En aquest cas la comprovació experimental s'ha fet per mutagènesi d'aquests residus i per rescat químic amb determinació per RMN dels productes de reacció. Si es substitueix algun dels dos residus catalítics s'obté una dràstica

⁷ S'han comprovat experimentalment els residus catalítics de la β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* (Withers *et al* (1992) *Biochemistry* 31, 9979-9985, Wang *et al* (1995) *Biochemistry* 34, 14554-14562) i la β -glucosidasa de *Sulfolobus solfataricus* (Moracci *et al* (1996) *Prot. Eng.* 9, 1191-1195).

reducció de l'activitat de l'enzim: l'activitat en k_{cat} es redueix 3 ordres de magnitud si es substitueix l'àcid/base general; si es substitueix el nucleòfil la reducció és de 6 ordres de magnitud (Taula III.1). El rescat químic dels mutants s'ha fet usant azida sòdica com a nucleòfil. Amb el substrat activat 2,4-dinitrofenil glucòsid el mutant E178A experimenta un augment de 200 vegades en la seva activitat catalítica (k_{cat}) a la concentració de 50 mM d'azida sòdica, el mutant E383A augmenta 100 vegades a 1 M d'azida. S'ha determinat estructuralment els productes de la reacció per seguiment per espectroscòpia de ^1H -RMN (Figura III.2). El mutant E178A rendeix el producte β -glucosil azida, mentre que el E383A dona l' α -glucosil azida. Així, els resultats aporten una prova funcional que el residu E178 és el catalitzador àcid/base general, i que el E383 és el nucleòfil catalític.

Taula III.1. Paràmetres cinètics del wt i els mutants E178Q, E178A, E383Q i E383A de la Bgl3 de *Streptomyces* sp. amb el substrat p-nitrofenil glucòsid (pNPGlu). Condicions: tampó fosfat sòdic 50 mM, pH 6,5, 50 °C (wt, E178Q i E178A); pH 7,0, 30 °C (E383A, E383Q).

Enzim	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
wt	0,15	28,4	$1,90\cdot 10^5$
E178Q	0,02	0,015	$7,77\cdot 10^2$
E178A	0,65	0,036	$5,52\cdot 10^1$
E383Q	0,20	$\approx 3\cdot 10^{-5}$	$1,6\cdot 10^{-1}$
E383A	0,03	$\approx 4\cdot 10^{-5}$	1,4

Quan el substrat entra al centre actiu, i perquè sigui hidrolitzat, l'àcid carboxílic de la cadena lateral del glutàmic 178 ha d'estar protonat, mentre que el residu Glu-383 ha d'estar desprotonat. Perquè dos residus iguals i molt propers a l'espai estiguin en un estat iònic diferent són necessàries certes interaccions que modulin el $\text{p}K_a$ de la seva cadena lateral. El $\text{p}K_a$ dels residus catalítics s'ha calculat a partir de la corba d'activitat respecte al pH. Si es representa la k_{cat} en funció del pH, els punts d'inflexió que s'obtenen es poden fer correspondre als $\text{p}K_a$ dels residus catalítics en el complex enzim-substrat ($\text{p}K_a$ cinètics); per altra banda, si es representa l'activitat en funció del quocient k_{cat}/K_M la informació que s'obté és sobre l'estat de ionització a l'enzim lliure. El $\text{p}K_a$ del carboxil del residu E178 per a l'enzim lliure és de 7,5, mentre per al complex enzim-substrat és de 7,1. Així el $\text{p}K_a$ de l'àcid/base general disminueix en el complex enzim-substrat respecte a l'enzim lliure. Aquest resultat és contradictori al que s'ha trobat a la bibliografia per a β -glucosidases de la família 1: la *Abg* d'*Agrobacterium faecalis* augmenta des de 7,2 per al $\text{p}K_a$ de l'enzim lliure a 8,0 per al $\text{p}K_a$ del complex enzim substrat⁸; però hi ha molt poques glucosidases estudiades i en canvi hi ha exemples d'altres glicosilhidrolases on es produeix el mateix efecte que nosaltres observem. Un cas paradigmàtic és la xilanasa de *Bacillus circulans* on s'ha observat una davallada de 2,6 punts de pH per al carboxil de

⁸ Kempton i Withers (1992) *Biochemistry* 31, 9961-9969.

l'àcid/base general en el complex enzim substrat⁹. La baixada del pK_a afavoreix que el residu catalític pugui actuar com a base general en el següent pas de la catàlisi. Els possibles motius pels quals a la Bgl3 disminueix el pK_a de l'àcid/base general són: a) La unió del residu nucleòfil a la meitat no reductora del substrat fa que desaparegui una càrrega negativa al centre actiu i per tant l'entorn de l'àcid/base resulta menys àcid; b) pot ser que el pK_a del E178 estigui augmentat per algun altre residu acídic que hi interaccioni, i que aquesta interacció es trenqui a l'intermediari glicosil-enzim; c) una hipòtesi contrària seria una possible interacció bàsica sobre aquest residu només a l'intermediari; d) una hidratació del centre actiu també podria reduir el pK_a de l'àcid/base general, i aquesta es podria donar per la sortida de l'aglicó un cop s'ha format l'intermediari glicosil-enzim. En els casos de β -glucosidases on es dona la situació contrària, pot passar al revés que els punts *b*, *c* i *d* ja que el punt *a* és comú: així s'ha hipotetitzat que l'augment del pK_a en el complex enzim-substrat es suposa per la reducció de l'aigua a l'interior del centre actiu, que dona un caràcter més hidrofòbic que desestabilitzaria la base conjugada de l'àcid general¹⁰.

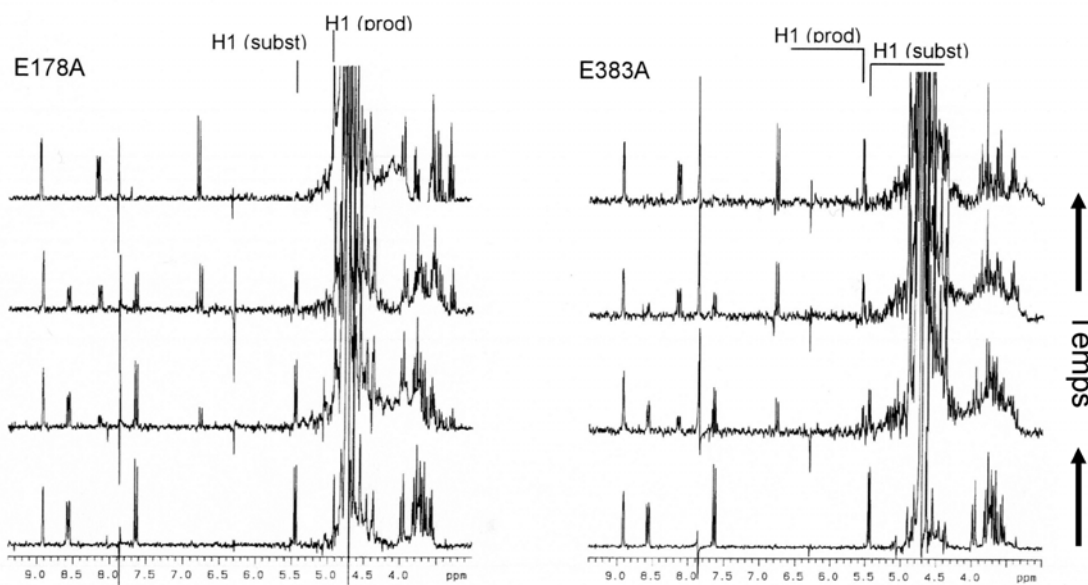


Figura III.2. Seguiment per RMN del rescat químic dels mutants E178A i E383A amb azida sòdica. Perfil de Ressonància Magnètica Nuclear de la reacció d'hidròlisi de 2-4-dinitrofenil glucòsid catalitzada pels mutants de Bgl3 E178A i E383A respectivament: Els perfils són des de temps zero fins a 19 hores de reacció per al E178A i fins a 48 hores per al E383A. Es destaca a les dues gràfiques la desaparició del senyal del substrat al doblet δ 5,45 ppm que correspon al H-1 del 2,4DNPG, i l'aparició del senyal de producte, amb el mutant E178A el senyal apareix com a doblet a δ 4,75 ppm que correspon a l'H-1 del β -glucosil azida; amb el mutant E383A el senyal apareix com a doblet a δ 5,55 ppm que correspon a α -glucosil azida.

⁹ McIntosh *et al* (1996) *Biochemistry* 35, 9958-9966.

¹⁰ Ausín (1999) TFC. IQS. Barcelona.

L'entorn més proper del glutàmic 178 està format per residus polars (asparagines 307, 235 i 177, i cisteïna 181, veure la figura III.3). L'asparagina 307 es troba equidistant entre el E178 i el nucleòfil E383 (Figura III.4). L'asparagina 235 es troba més llunyana, a 4,1 Å, però pot continuar tenint influència. L'asparagina 177 interacciona amb el substrat, però la seva proximitat pot influir a l'estat iònic del E178.

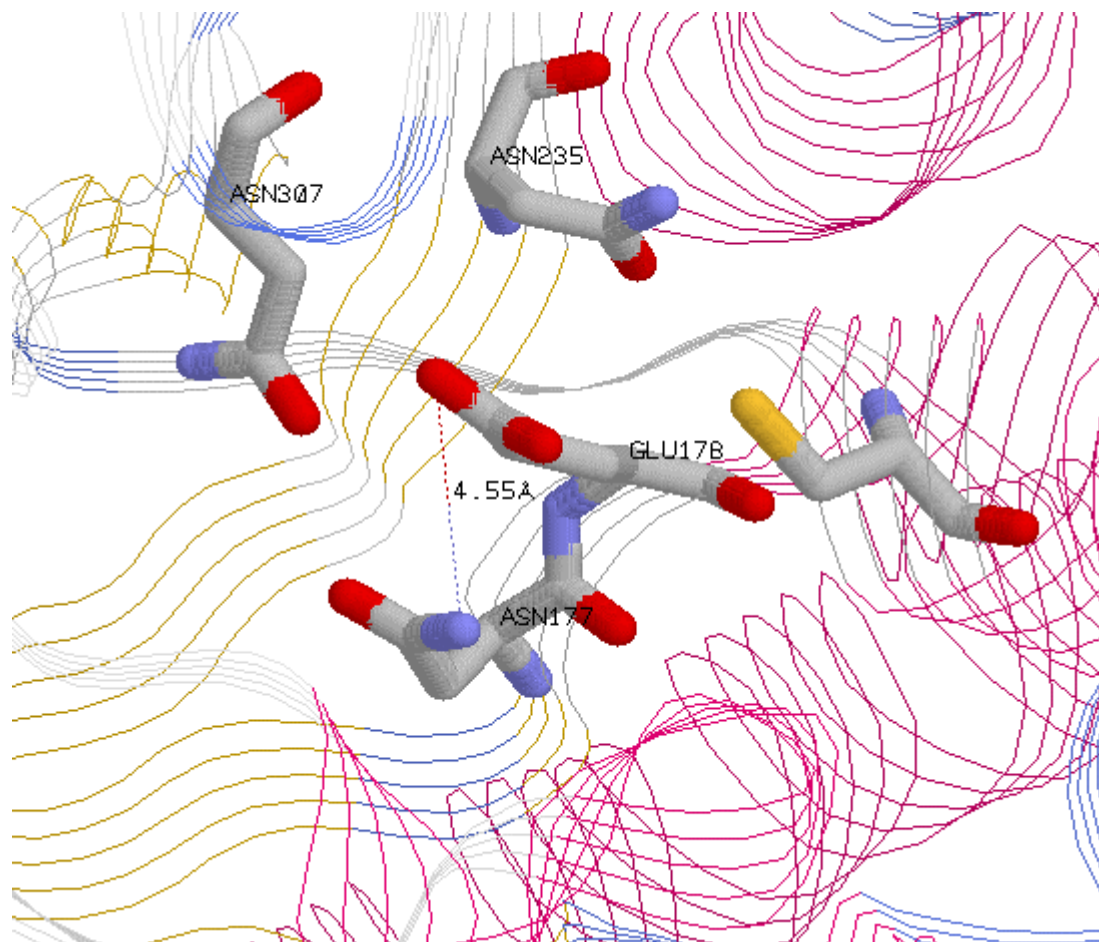


Figura III.3. Entorn del glutàmic 178 de la β -glucosidasa Bgl3. La figura està feta a partir de les coordenades dipositades al Protein Data Bank (1GNX). La figura està feta amb el programa RASMOL. Les estructures secundàries estan representades amb groc (làmines beta) i rosa (hèlix beta).

El pK_a del glutàmic 383 està molt influït per l'arginina 89 que acosta un dels tres grups NH_3 a tan sols 3.02 Å d'un oxigen carboxílic del nucleòfil (Figura III.5). La interacció electrostàtica entre R89 i E383 es suposa que es trenca per la formació de l'intermediari glicosil-enzim: El glutàmic es mou separant-se de l'arginina, i s'interposa una molècula d'aigua que apantallaria la càrrega positiva de l'arginina¹¹. Aquest fenomen permet al residu nucleòfil augmentar el seu pK_a quan necessita desestabilitzar l'enllaç èster per a dur a terme el següent pas de la catàlisi (deglicosidació). Malauradament, no ha estat possible determinar el canvi en el pK_a del glutàmic 383 a la Bgl3 perquè l'enzim precipita a pH àcids i això provoca interferències a les

¹¹ En co-cristalls amb l'inhibidor 2-F-glucosa s'ha observat que la interacció del nucleòfil amb l'arginina es trenca (Burmeister *et al* (1997) *Structure* 5, 663-675).

cinètiques: la precipitació dóna lloc a un augment progressiu de terbolesa a la mescla de reacció i a les corbes de progrés obtingudes queda reflectit en un percentatge elevat però indeterminable aquest augment de la terbolesa. Els estudis fets amb altres β -glucosidases de la família 1 (*Agrobacterium faecalis*¹² i *Pyrococcus furiosus*¹³) presenten mancances similars per a trobar un pK_a prou acurat per al nucleòfil (amb i sense substrat). Pel que fa a la interacció entre el residu nucleòfil i l'arginina (R89 a la numeració de la Bgl3) només s'ha pogut observar que es trenca a l'intermediari glicosil-enzim amb cocrystals amb l'inhibidor 2-fluoro-2-deoxi-glucosa i només s'ha aconseguit aquest complex per una de les 9 estructures resoltes¹⁴.

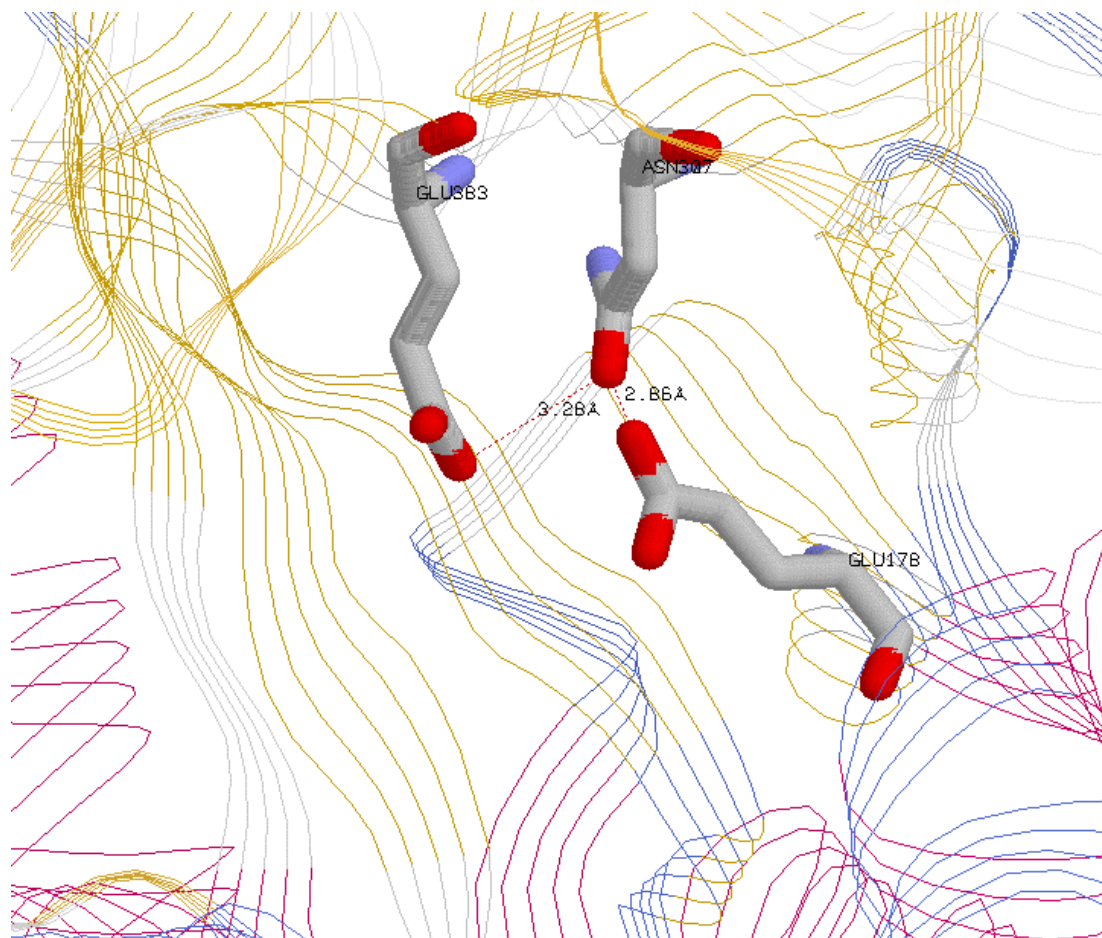


Figura III.4. Posició de l'asparagina 307 respecte als residus catalítics E178 i E383.

III.4. Interaccions amb el substrat

El pas cap endins definitiu del substrat es produeix de forma simultània al primer pas de l'etapa catalítica. El substrat quan entra al centre actiu pateix unes interaccions que el deformen. D'aquesta manera es facilita la ionització del carboni anomèric per pèrdua de

¹² Kempton i Withers (1992) *Biochemistry* 31, 9961-9969.

¹³ Bauer i Kelly (1998) *Biochemistry* 37, 17170-17178.

¹⁴ Burmeister *et al* (1997) *Structure* 5, 663-675.

l'aglicó. Per l'anàlisi de Hammett, la relació entre k_{cat} i $\text{p}K_{\text{a}}$ de grups sortints relativament dolents mostra una elevada pendent; això sembla indicar que l'estat de transició a la primera etapa de la catàlisi és molt tardà, és a dir, que l'intermediari de reacció oxocarbocatiònic està molt estabilitzat per interaccions del centre actiu i per tant l'aglicó no s'allibera fins que està a punt de produir-se la interacció entre el carboni anomèric (amb una càrrega positiva molt accentuada) i un dels oxígens del residu nucleòfil. La formació de l'intermediari oxocarbocatiònic amb una càrrega tan desenvolupada és possible gràcies que les interaccions amb residus del centre actiu l'estabilitzen. D'entre aquests residus, la tirosina 309 estableix un pont d'hidrogen amb l'oxigen de l'anell del sucre (extrem no reductor). Recentment s'ha observat a l'estructura tridimensional d'una xilanasa de la família 11 cocrystal·litzada amb un inhibidor, que la tirosina presenta també un pont d'hidrogen amb l'oxigen èster del nucleòfil¹⁵. A més, la distància entre l'oxigen de la tirosina i l'oxigen de l'anell del substrat és molt petita (al voltant de 3 Å) i és possible que a l'estat de transició la tirosina estabilitzi l'electrofilia de l'oxigen de l'anell generada per l'estat carbocatiònic del carboni anomèric¹⁶. De

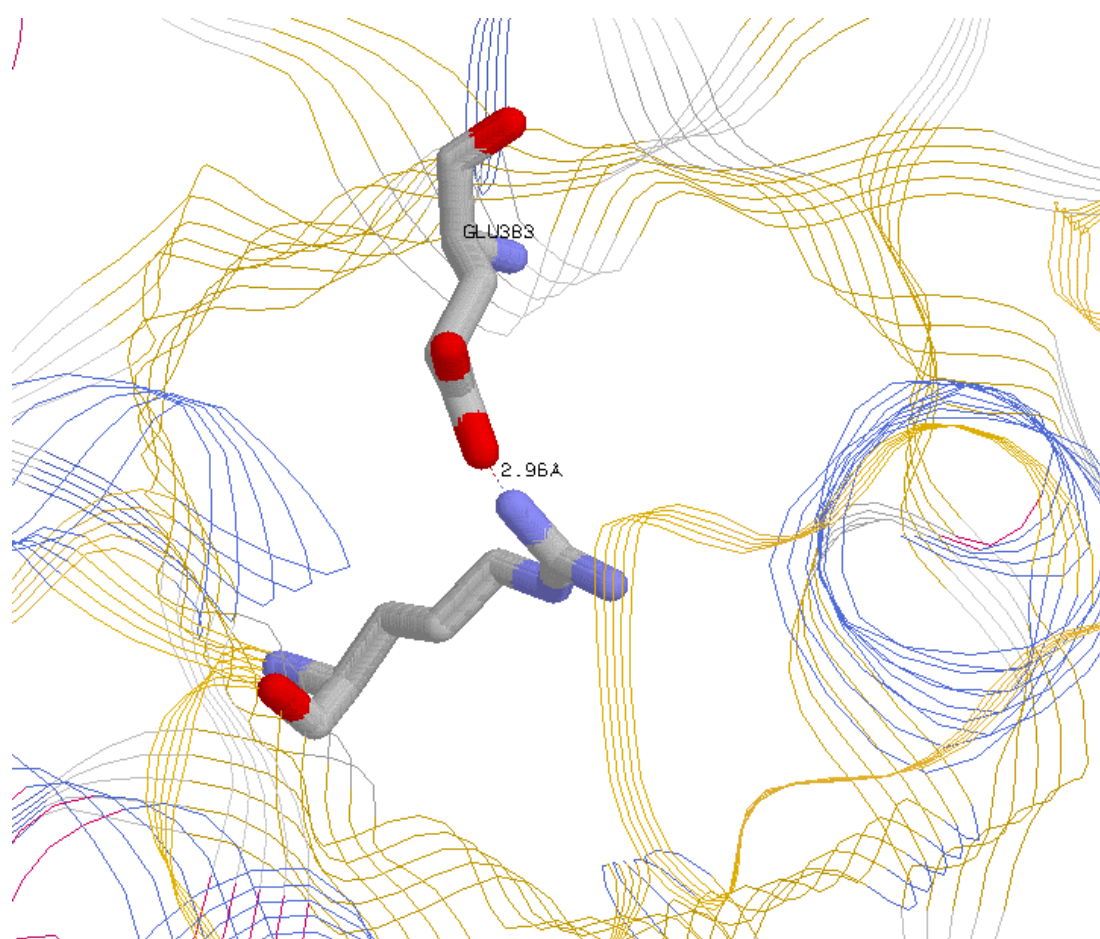


Figura III.5. Posició de l'arginina 89 respecte al residu catalític E383.

¹⁵ Sidhu *et al* (1999) *Biochemistry* 38, 5346-5354.

¹⁶ Zechel i Withers (2000) *Acc. Chem. Res.* 33, 11-18.

fet aquesta possibilitat s'ha plantejat només per a la xilanasa de *Bacillus circulans* on s'ha observat que la càrrega positiva està més desplaçada cap a l'oxigen de l'anell que no pas cap al carboni anomèric, mentre es considera que l'estat de transició genèric per als enzims β -glicosídics té la càrrega positiva sobre el carboni anomèric. Aquesta tirosina es troba en una regió molt conservada i per tant també ho estarà la seva orientació al centre actiu.

Un altre residu important per a l'estabilització de l'intermediari carbocatiònic és l'asparagina 177: es troba també en una regió molt conservada formada per 4 residus hidrofòbics que ancoren la seva posició al centre actiu d'una manera molt rígida. Aquest residu duria a terme el seu paper estabilitzador a través de la interacció amb l'oxigen de l'hidroxil del carboni 2, és a dir per l'altra banda del carboni anomèric. Aquesta funció és fonamental en la hidròlisi i s'ha detectat una reducció molt elevada de la velocitat d'hidròlisi amb substrats sense aquest hidroxil¹⁷. A la funció d'estabilització de l'intermediari de reacció s'hi afegeix el paper en l'especificitat de substrat, i per tant en la interacció amb aquest per al seu correcte posicionament, i fins i tot per ajudar a la torsió de l'anell glucídic. En algunes glicosilhidrolases s'ha observat que el mateix residu nucleòfil estableix la interacció amb l'hidroxil del C2 del sucre¹⁸, però com es pot veure a la figura III.6, la distància entre l'oxigen del C2 i el nitrogen del grup funcional del N177 és suficientment petita perquè es pugui realitzar una interacció; de totes maneres no és descartable que el nucleòfil també hi interaccioni.

La resta d'interaccions al **subseti -1** les porten a terme els residus Q32, H133, W430, E437, W438 i F446 (Figura III.7)¹⁹; els 3 primers es troben totalment conservats entre les diferents glucosidases de la família 1; el E437 i la F446 es troben substituïts a les 6-fosfoglicosidases per serina i per tirosina respectivament; el W438 està també conservat a tots els membres de la família 1 excepte les 6-fosfoglicosidases que tenen en el seu lloc fenilalanina i alanina. La histidina 133 es troba situada entre l'asparagina 177 i la glutamina 32; segurament interacciona amb l'hidroxil del C3. La glutamina 32 interacciona amb els hidroxils del C3 i del C4. El triptòfan 438 es troba per sobre de la Q32 i té orientat el nitrogen del seu anell per a fer un pont d'hidrogen amb l'hidroxil del C3²⁰. El glutàmic 437 interacciona amb els hidroxils del C4 i del C6. El triptòfan 430 fa una interacció hidrofòbica amb el C6, encara que no es descarta un possible pont d'hidrogen entre l'oxigen de l'anell aromàtic del triptòfan i l'hidroxil del C6. I la fenilalanina 446 que fa una interacció hidrofòbica amb el C6.

¹⁷ Namchuk i Withers (1995) *Biochemistry* 34, 16194-16202, Rivera-Sagredo *et al* (1992) *Eur. J. Biochem.* 209, 415-422 i Fernández *et al* (1995) *Carbohydrate Research* 271, 31-42.

¹⁸ En aquests casos l'asparagina es troba igualment conservada però passa a un segon pla i el seu paper és estabilitzar la càrrega negativa del nucleòfil (Heightman i Vasella (1999) *Angew. Chem.* 38, 750-770).

¹⁹ La descripció de les interaccions s'ha fet en base a Burmeister *et al* (1997) *Structure* 5, 663-675, i a Sanz-Aparicio *et al* (1998) *J. Mol. Biol.* 275, 491-502, i s'ha analitzat amb un model de la Bgl3 amb l'inhibidor 2-fluoro-2-deoxi-glucosa (treball 3).

²⁰ Aquest triptòfan tampoc es troba conservat a la mirosinasa, que té en el seu lloc fenilalanina.

Entre aquests residus hi ha altres que o bé ajuden a orientar correctament els primers o bé fan interaccions hidrofòbiques amb l'anell de la glucosa²¹. Es tractaria dels residus W134 i W438 (Figura III.8).

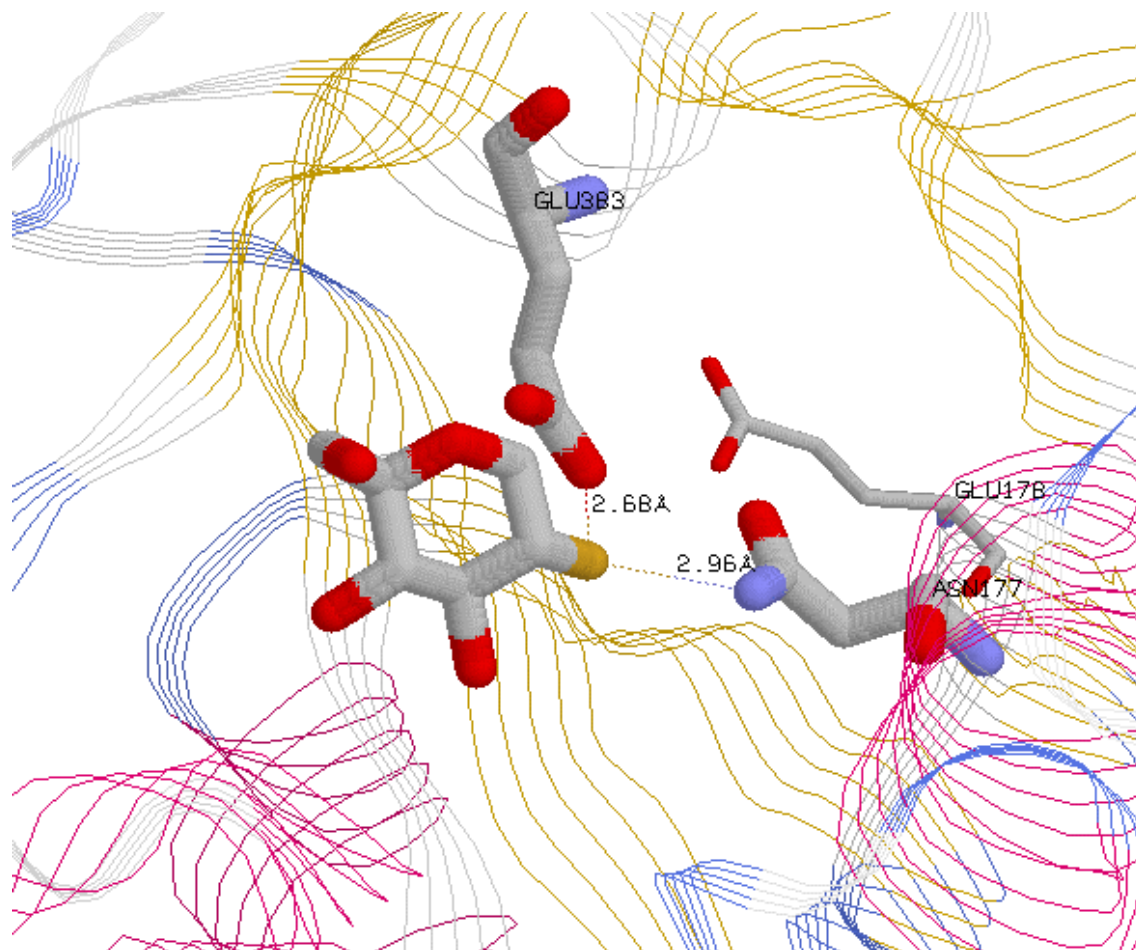


Figura III.6. Detall del centre actiu de la Bgl3 marcant les distàncies a l'hidroxil del C2 del glutàmic 383 i de l'arginina 177. L'estructura correspon al model resultant de la superposició de l'estructura de la miosinasa amb l'inhibidor 2-fluoro-2-deoxi-glucosa (1E70), amb l'estructura de la Bgl3 (1GNX).

Les β -glucosidases de la família 1 presenten una baixa selectivitat per l'extrem no reductor entre glucosa o galactosa, en canvi les de la família 2 són molt selectives per a la galactosa²². La baixa selectivitat de la família 1 es donaria per l'existència d'interaccions potencials per a cada orientació de l'hidroxil del C4: equatorial per a la glucosa i axial per a la galactosa. Les interaccions a les dues orientacions les porten a terme l'arginina 32 i el glutàmic 437 que experimenten una insignificant reorganització de la seva posició per adaptar-se al substrat²³. També hi pot estar implicat el triptòfan 438 encara que hi ha divergències entre les diferents

²¹ L'anell dels sucres és un esquelet de carbonis i per tant una mica hidrofòbic; la glucosa presenta tots els hidroxils en el pla de l'anell i els enllaços perpendiculars a aquest pla els omplen els hidrògens substituents; té per aquest motiu un caràcter més hidrofòbic que els anells de la resta dels sucres.

²² Heightman i Vasella (1999) *Angew. Chem.* 38, 750-770.

²³ Sanz-Aparicio *et al* (1998) *J. Mol. Biol.* 275, 491-502.

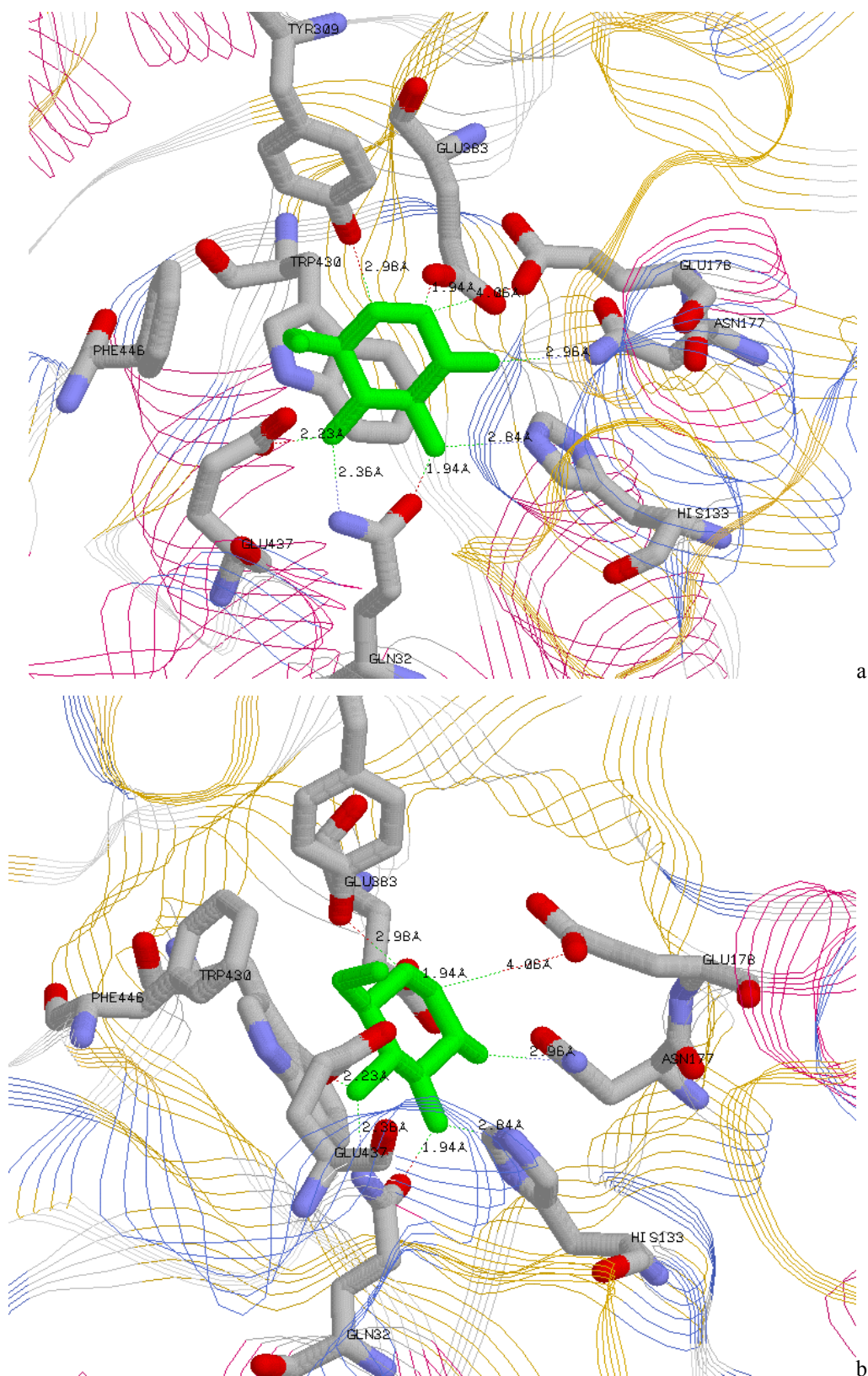


Figura III.7. Detall del subseti -1 del centre actiu de la Bgl3. Estan marcades les distàncies dels grups que poden fer ponts d'hidrogen amb els hidroxils de l'extrem no reductor del substrat. L'inhibidor 2-fluoro-2-deoxi-glucosa s'indica en verd. L'estructura correspon al model Bgl3 amb l'inhibidor (veure la figura III-6).

glicosidases de la família 1 amb estructura resolta: a la BglA de *Bacillus polymyxa* interacciona amb l'hidroxil del C3, a la 6-fosfo- β -galactosidasa de *Lactococcus lactis* s'ha descrit que fa un pont d'hidrogen amb l'hidroxil del C4, i aquesta mateixa interacció s'ha descrit per a la β -glicosidasa de *Sulfolobus solfataricus* amb galactòsids com a substrats però no s'ha descrit cap interacció amb el substrat quan l'extrem no reductor és una glucosa²⁴. La β -glucosidasa Bgl3 hidrolitza també substrats p-nitrofenil- β -galactòsids, com és comú per a la resta de la família (Taula III-2). Es destaca l'elevada K_M que té l'enzim amb el galactòsid, probablement perquè la galactosa es deforma menys al centre actiu i el primer pas de la catàlisi està molt alentit; paral·lelament l'intermediari glicosil enzim estaria menys estabilitzat i reaccionaria més ràpidament: per això s'observa una k_{cat} més elevada que amb el wt.

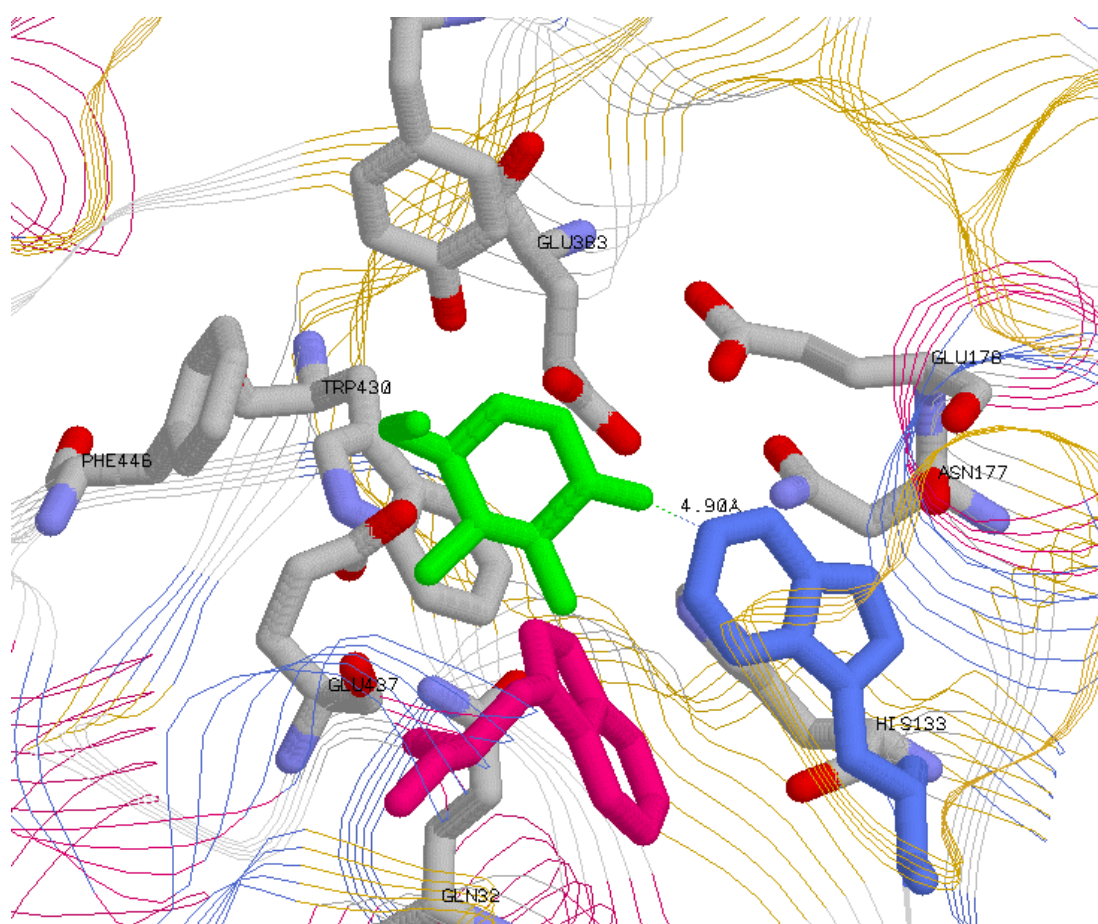


Figura III.8. Detall del subseiti -1 del centre actiu de la Bgl3. S'indiquen en rosa el triptòfan 438, en blau el triptòfan 134, i l'inhibidor 2-fluoro-2-deoxi-glucosa en verd. L'estructura correspon al model Bgl3 amb l'inhibidor (veure la figura III-6).

²⁴ Heightman i Vasella (1999) *Angew. Chem.* 38, 750-770.

Taula III.2. Paràmetres cinètics de la Bgl3 de *Streptomyces* sp. amb els substrats cel·lobiosa, pNPGlu, pNPFuc, pNPGal i pNPXyl. Condicions: tampó fosfat sòdic 50 mM, pH 6,5, 50 °C, [Bgl3] = 20µM. Amb aquestes condicions no s'ha detectat activitat per als substrats: pNPMAN, pNPArA.

Substrat	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)
cel·lobiosa	4,1	35,6	$8,60\cdot 10^3$
pNPGlu	0,15	28,4	$1,90\cdot 10^5$
pNPFuc	0,14	37,1	$2,65\cdot 10^5$
pNPGal	7,3	118	$1,61\cdot 10^4$
pNPXyl	3,0	0,63	$2,11\cdot 10^2$

Als estudis preliminars de l'estructura tridimensional de la Bgl3 amb o sense substrat s'ha observat que el residu, E437, presenta molta mobilitat depenent del que hi ha al centre actiu. La substitució d'aquest residu provoca una reducció de 5 a 200 vegades en k_{cat} per al mutant E437Q segons els substrats, i de 25 a 10000 vegades en k_{cat}/K_M ²⁵. Els resultats obtinguts són d'interès per a la possible aplicació d'aquest mutant en reaccions de transglicosidació, perquè canvia la seva especificitat de substrat passant a hidrolitzar, gairebé d'igual manera, substrats galactòsids i xilòsids que els glucòsids (substrat més eficient per a la forma salvatge).

Les interaccions al **subseti +1** són molt menys conservades entre les diferents glicosilhidrolases. En general hi ha molts residus aromàtics o hidrofòbics que ajuden a orientar el sucre, però sense fixar la regioespecificitat, que és molt flexible en aquests enzims en general i sobretot la Bgl3 en particular. Les interaccions que puguin fer tampoc es poden concretar massa mitjançant tècniques cristal·logràfiques. Això és degut a què el millor inhibidor, el 2-deoxi-2-fluoro-glucòsid, que és un substrat que alenteix tant la reacció de deglicosidació que es pot observar als cristalls, només permet veure les interaccions al subseti -1; i els altres inhibidors provats no es col·loquen a la posició de catàlisi exacta i per tant les interaccions no són les definitives durant la catàlisi²⁶. Una altra aproximació de l'estructura del substrat dins el centre actiu ha estat la comparació per RMN bidimensional (RMN TR-NOE) de la configuració que presenta un substrat amb o sense la presència d'enzim²⁷. El substrat lliure presenta 3 configuracions de mínima energia, i, d'aquestes, una és la que es fa majoritària quan s'afegeix l'enzim (Figura III.9). Això significa que la configuració que pren el substrat a dins del centre actiu es fa majoritària per ser més ràpida el flux d'entrada i sortida que no pas l'interconversió de les configuracions. L'estructura tridimensional de la Bgl3 amb un inhibidor disacàridic (tiocel·lobiosa) ha mostrat que al centre actiu la configuració que adopta és la mateixa predita per RMN; encara és possible, però, que el primer pas de la catàlisi provoqui un canvi en la

²⁵ Ferrer (2001) UAB. Barcelona.

²⁶ S'ha comprovat això pel fet que la distància entre el grup carboxílic del residu catalític nucleòfil i el carboni anomèric en aquests cristalls amb aquests inhibidors és massa elevada per poder tractar-se de la situació definitiva. Per altra banda el principal treball estructural sobre el subseti +1 amb inhibidors ha estat amb una aril-glucosidasa (Zouhar *et al* (2001) *Plant Physiology* 127, 973-985).

²⁷ Montero *et al* (1998) *FEBS Letters* 421, 243-248 (annex d'aquesta tesi), i Montero (1998) Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

configuració del disacàrid. De fet si es superposa la cel·lobiosa en la configuració determinada a l'intermediari glicosil enzim, s'observa com es superposa l'anell de la glucosa amb el carboxil del E178 (Figura III.11, pàgina 88).

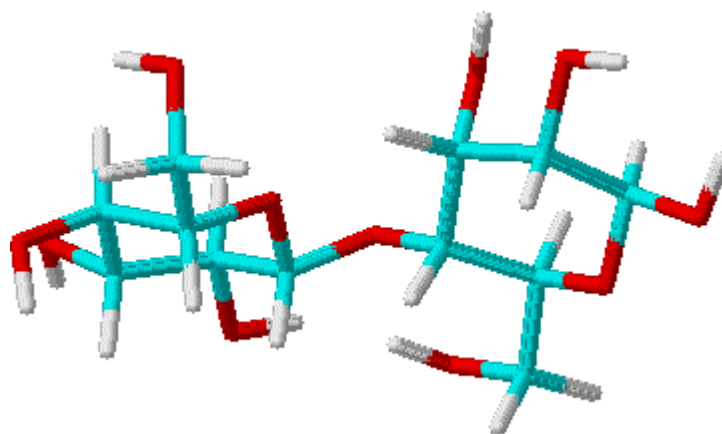


Figura III.9. Estructura de la cel·lobiosa amb els angles de torsió de l'enllaç glicosídic 55° (ϕ) i -10° (ψ); tal com s'ha demostrat que entra al centre actiu.

Els aminoàcids que tenen la seva cadena lateral orientada al que seria el subseti +1 són aquests: W134, W180, L185, Y309, M354, W356, W438 i F446 que farien un anell de residus aromàtics, i C181, H192, N235, H237, S310 i H440 que podrien tenir alguna interacció de pont d'hidrogen amb els hidroxils de l'aglicó.

A la figura III.10 es pot veure l'alineament de les glucosidases amb estructura coneguda; es pot comprovar que els residus indicats al paràgraf anterior es troben poc conservats. Això contrasta amb els residus del subseti -1, fortament conservats. Si es comparen totes les seqüències de la família 1 s'observa que l'estat de conservació dels residus del subseti +1 depèn de l'activitat (β -glucosidasa, 6-fosfo- β -glicosidasa, aril-glicosidasa,...) i del regne (Eukarya, Archaea i Bacteria). A la taula III.4 es troba resumit l'estat de conservació d'aquests residus.

Els residus més conservats d'aquest subseti són els que interaccionen també amb l'extrem no reductor (Y309 i W356). També estan molt conservats alguns dels aromàtics de la cavitat del centre actiu; es tracta del W134 i la F446, els quals es troben molt conservats a totes les subfamílies, excepte les 6-fosfo-glicosidases que presenten un altre residu aromàtic. La resta dels residus que s'orienten al subseti +1 estan molt conservats entre les β -glucosidases bacterianes però en canvi no presenten un patró comú per a la resta de les famílies. Concretament la cisteïna 181 està molt conservada entre les β -glucosidases bacterianes, encara que també hi ha alguna substitució per valina; als altres enzims de la família 1 hi abunda la valina i la serina i només les β -glucosidases de fongs tenen cisteïna en aquesta posició.

Per l'anàlisi de l'estructura tridimensional i per la possible ubicació del substrat dins el centre actiu es pot dir quines són les possibles interaccions entre l'enzim i l'extrem reductor o aglicó del substrat (Figura III.12). Hi participen el W134, la C181, el W180, la N235, i

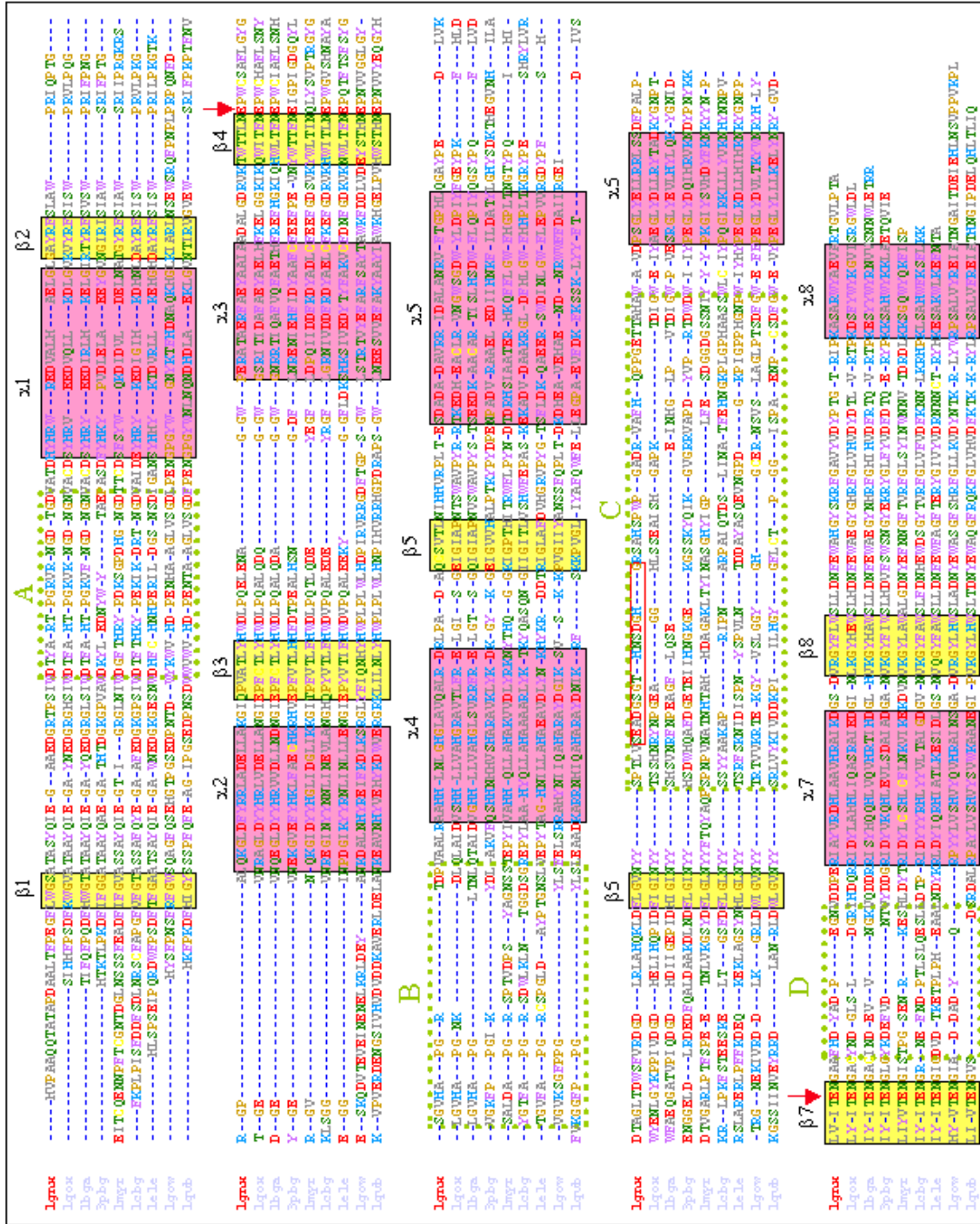


Figura III.10. Alineament estructural de les β -glucosidases amb estructura tridimensional coneguda. 1gnx, *Streptomyces* sp (Q59976); 1qox, *Bacillus circulans* (Q03506), 1bga, *Bacillus polymyxa* (P22073); 3pbg, *Lactococcus lactis* (P11546); 1myr, *Sinapis alba*; 1cbg, *Trifolium repens* (P26205); 1e1e, *Zea mays* (P49235); 1gow, *Sulfolobus solfataricus* (P22498); 1qvb, *Thermosphaera aggregans* (Q9YG48). Estan indicades les làmines beta (quadres grocs) i les hèlixs alfa (quadres rosats) del barril, i els quatre llaços principals (marc de punts verds). El codi de colors dels residus és: cisteïna en groc, prolina i glicina en taronja, aromàtics en lila, resta hidrofòbics en gris, polars en verd, carregats positivament en vermell i carregats negativament en blau. (Cedit per la Dra. A. Guasch)

la N307. Aquestes interaccions ajudarien a fixar aquest extrem per facilitar la deformació que pateix l'extrem no reductor en el primer pas de la catàlisi.

Taula IV.2. Conservació dels residus situats al centre actiu. A la segona columna s'indiquen els residus del centre actiu de la Bgl3. A les quatre columnes següents les substitucions trobades per a cada posició i la seva freqüència (subíndexs) en un llistat seleccionat de seqüències (seqüències de glicosidases bacterianes amb l'enzim purificat més una selecció (per estructura coneguda principalment) de representants dels altres dos regnes). S'han omès els residus que participen a la interacció amb el subseti -1 que es troben pràcticament del tot conservats. Si només hi ha un residu significa que està totalment conservat. (n. c.: no conservada); (n. d.: no determinada)

Subseti	Residu/posició (respecte Bgl3)	Bactèries		Arqueobactèries	Eucariotes	Paper funcional descrit
		β -glucosidasa	6-fosfo- β -glucosidasa			
+1	W134	W	F ₁₁ , Y ₆ , W ₁	W ₄ , F ₂	W	Staquing
	W180	W ₁₂ , Y ₂ , G ₁	N ₁₂ , G ₃ , I ₂	N ₄ , M ₂	W ₂ , L ₁ , Y ₁ , Q ₁	anell d'aromàtics
+1	C181	C ₁₃ , V ₄	V ₆ , S ₄ , P ₃ , N ₃ , M ₂	C ₂ , T ₂ , G ₁	V	Interacció hidrofòbica
	L185	L ₁₄ , V ₁	G ₆ , A ₄ , Q ₂ , L ₂ , W ₂	L ₃ , Q ₂ , M ₁	P ₁ , L ₁ , N ₁ , R ₁ , F ₁	anell d'aromàtics
+1	H192	H	F ₄ , H ₂	F ₅ , W ₁	F ₄ , D ₁	n. d.
+1	N235	N ₁₄ , D ₁	A ₁₀ , L ₄ , N ₂	A ₄ , V ₁ , P ₁	N ₂ , V ₁ , D ₁ , I ₁	Possible interacció àcid/base catalític
	H237	n. c.: T ₃ , S ₃ , H ₂ , R ₂ , F ₂	n. c.: P ₃ , T ₃ , G ₃ , V ₃ , M ₂ , Q ₁ , I ₁ , D ₁ , E ₁	S ₂ , A ₁ , Q ₁ , Y ₁ , M ₁	D ₂ , H ₁ , R ₁ , M ₁	n. d.
	S310	S ₆ , T ₆ , A ₂ , N ₁ , R ₁	M ₁₂ , M ₂ , A ₂ , F ₁ , C ₁	T ₄ , S ₂	T ₃ , V, S	n. d.
	M354	M ₁₁ , I ₄	W ₁₆ , R ₂	F ₄ , I ₁ , M ₁	P ₂ , A ₁ , S ₁ , F ₁	n. d.
+1	W356	W	W	W	W ₄ , N ₁	staquing
	H440	E ₆ , H ₂ , F ₂ , Y ₂	T ₁₀ , N ₇	Q ₂ , S ₂	E ₁ , S ₁ , K ₁ , A ₁	n. d.
+1	F446	F	Y	F	F ₄ , Y ₁	anell d'aromàtics

Pel que fa a l'estudi del paper de la cisteïna 181 en la interacció del substrat, les conclusions que es poden extreure dels resultats resumits a la taula III.3 són:

1) Totes les substitucions realitzades han afectat significativament l'activitat enzimàtica, sembla doncs, un residu clau en la catàlisi o, si més no, important per a l'eficiència catalítica de l'enzim. No obstant això, només es troba conservada en algunes glucosidases bacterianes; les glucosidases d'eucariotes i d'arqueobactèries tenen en aquesta posició principalment valina, treonina, i glicina, amb un grau de conservació considerable.

2) Les constants catalítiques obtingudes per pNPG i cel-lobiosa per a les diferents substitucions de la Cys-181 realitzades, suggereixen que la seva funció és de reconeixement del substrat mitjançant interacció principalment hidrofòbica.

3) La Cys-181 es troba al centre actiu prop del residu que actua de catalitzador àcid/base general (Glu-178); les substitucions a la posició 181 per aminoàcids amb càrrega tindrien efecte sobre el pK_a del residu catalític i produirien alteracions més enllà de les relacionades amb la interacció amb el substrat.

4) Per a moltes substitucions a la posició 181 es produeix la pèrdua d'inhibició per excés de substrat que presenta el wt (i algun altre mutant) per al substrat pNPG. Es suposa que l'origen

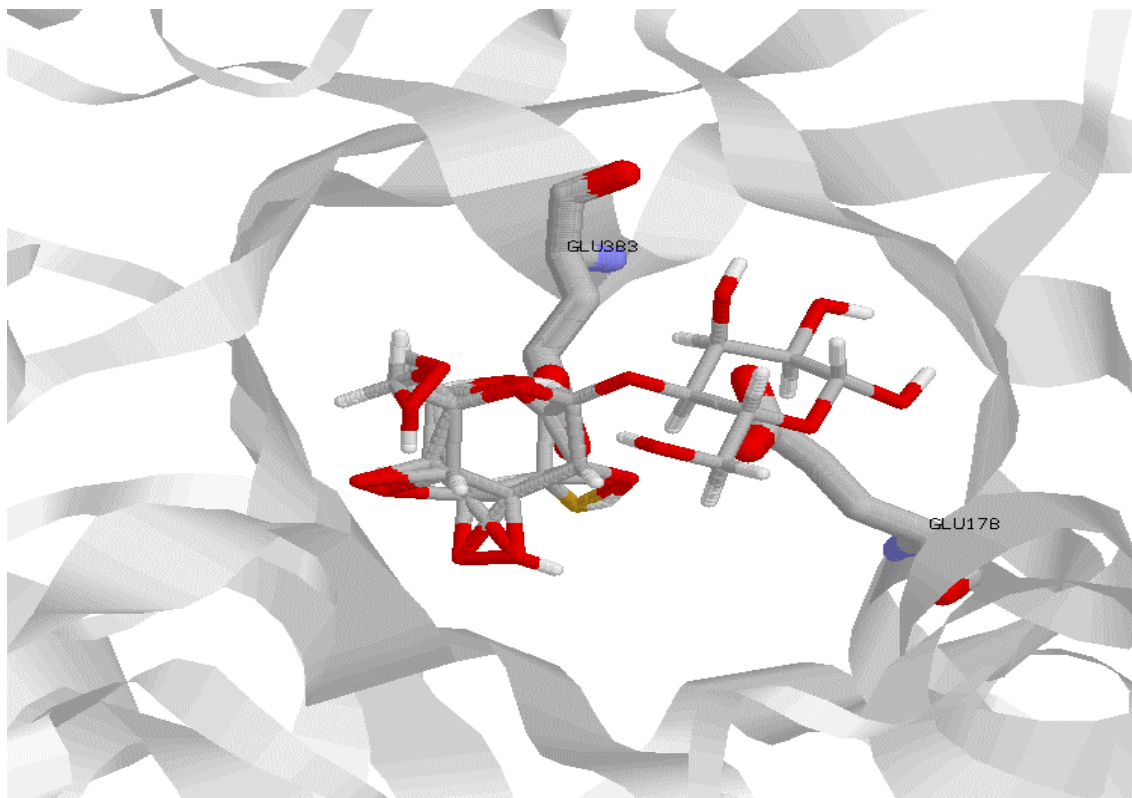


Figura III.11. Superposició manual de la cel·lobiosa a l'inhibidor de 2-fluoro-2-deoxi-glucosa al centre actiu a l'estructura modelada (veure la figura III.6).

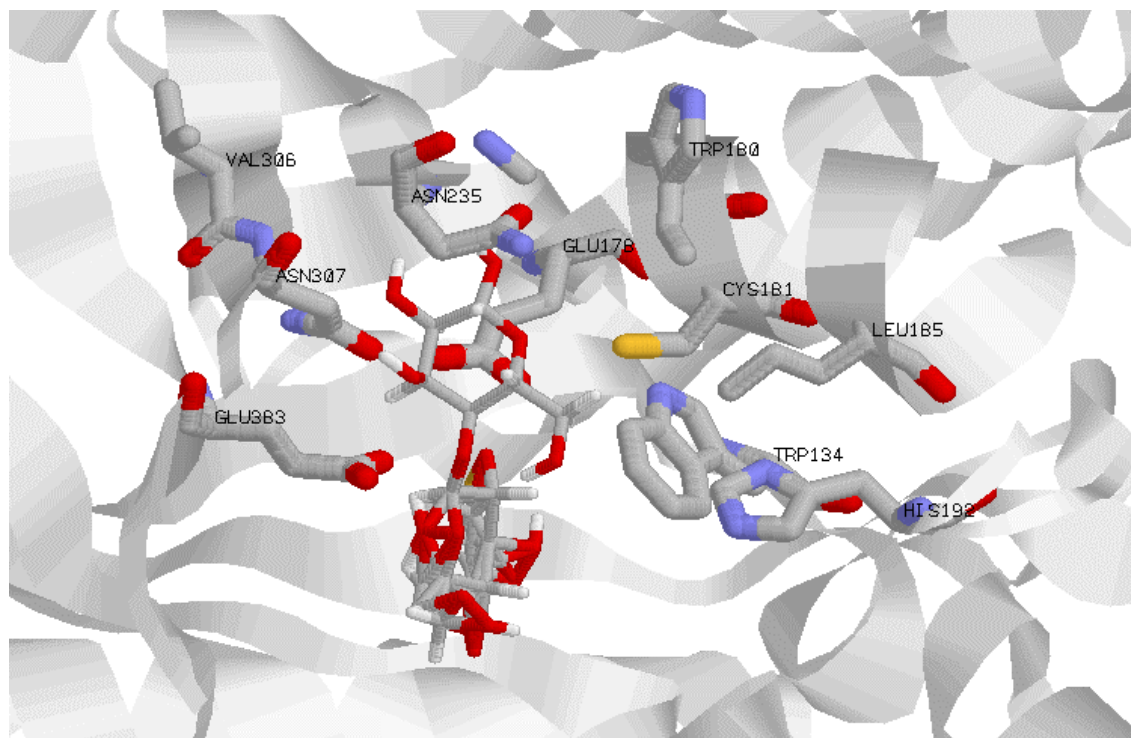


Figura III.12. Estructura del subseti +1. Possibles residus implicats en la interacció sobre l'extrem reductor del substrat. El substrat correspon a la superposició de la cel·lobiosa a l'inhibidor 2FG (veure la figura III.11).

d'aquesta inhibició està en l'activitat transglicosidasa: si es produeix transglicosidació en comptes d'hidròlisi per elevades concentracions de substrat, i alhora el producte de transglicosidació és un bon substrat, s'observarà una reducció aparent de l'activitat. Fenòmens semblants ja s'han observat per a altres glucosidases i s'han detectat productes d'hidròlisi encara que no s'ha quantificat la importància d'aquest fenomen: a l'enzim d'*Agrobacterium faecalis* no s'observa inhibició per excés de substrat sinó una cinètica bifàsica, és a dir l'enzim s'activa a altes concentracions de substrat²⁸; l'explicació és que l'enzim és més actiu per transglicosidació que per hidròlisi, però no es produiria inhibició perquè, a diferència de la Bgl3, el producte de transglicosidació no seria hidrolitzable. Si es confirmés aquesta hipòtesi significaria que la C181 participa en l'orientació d'una segona molècula de substrat que reaccionaria amb el complex enzim-substrat generant un sucre per transglicosidació.

Taula III.3. Paràmetres cinètics del wt i els mutants del residu C181 per S, Q, A, L, P, F, Y, R, K, D i E amb els substrats cel·lobiosa i pNPGlu. Condicions: tampó fosfat sòdic 50 mM, pH 6,5, 50 °C (pH 7,0 i 30 °C per als enzims més inactius amb cel·lobiosa, L, F, R i E). Amb pNPG, el wt i els mutants C181V i C181D presenten inhibició per excés de substrat ($K_i = 1,4, 6,12$ i 82 mM respectivament). Per als mutants L, R i D el valor de k_{cat}/K_M amb cel·lobiosa s'ha calculat com la pendent de les corbes de progrés ($v_0/[E] = k_{cat}/K_M \cdot [S]$) per no observar-se saturació.

Enzim	pNPG			cel·lobiosa		
	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
wt (*)	0,15	28,4	$1,9 \cdot 10^5$	4,13	35,6	$8,6 \cdot 10^3$
C181S	1,49	10,5	$7,0 \cdot 10^3$	47,2	26,9	$5,7 \cdot 10^2$
C181Q	110	113	$1,0 \cdot 10^3$	92,4	168	$1,8 \cdot 10^3$
C181A	0,10	12,8	$1,3 \cdot 10^5$	76,8	23,9	$3,1 \cdot 10^2$
C181V (*)	0,024	7,63	$3,1 \cdot 10^5$	33,6	0,33	$1,0 \cdot 10^1$
C181L	0,019	3,33	$1,7 \cdot 10^5$	>360	$>5 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$
C181P	0,065	32,8	$5,0 \cdot 10^5$	77,2	25,8	$3,3 \cdot 10^2$
C181F	0,082	2,43	$2,9 \cdot 10^4$	>360	$>3 \cdot 10^{-2}$	$8 \cdot 10^{-2}$
C181Y	0,090	3,04	$3,3 \cdot 10^4$	>360	$>2 \cdot 10^{-2}$	$7,6 \cdot 10^{-2}$
C181R	1,47	5,02	$3,4 \cdot 10^3$	>360	$>6 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$
C181K	1,10	0,18	$1,7 \cdot 10^2$		$<5 \cdot 10^{-4}$	
C181D (*)	1,02	0,11	$1,1 \cdot 10^2$	89,5	0,0027	$3,1 \cdot 10^{-2}$
C181E	0,17	12,4	$7,4 \cdot 10^4$	>360	>3	9,0

III.5. Activitat glicosintasa

Com ja s'ha comentat a la introducció (apartat I.7), una important aplicació de les glucosidases és la síntesi de sucres. La tècnica de la glicosintasa ofereix, per l'elevada eficiència i versatilitat, unes perspectives de futur molt bones pel que fa a la seva aplicació en la

²⁸ Kempton i Withers (1992) *Biochemistry* 31, 9961-9969.

síntesi a gran escala d'oligosacàrids per al seu ús principalment en medicina²⁹. L'estratègia de la glicosintasa es basa en l'ús de glicosidases amb el residu nucleòfil substituït per un residu no nucleofílic: la glicosidasa perd la seva capacitat d'hidrolitzar enllaços glicosídics, però pot en el seu lloc catalitzar la glicosidació de sucres acceptors utilitzant donadors glicosídics activats (fluoro derivats). Aquesta estratègia només serveix per a enzims que actuen amb retenció de la configuració del carboni anomèric; tot i així no ha estat possible aplicar-la a totes les glicosidases que s'han provat. De fet només s'han publicat en els cinc anys transcorreguts des que es va descriure per primer cop³⁰, 7 β -glicosintases i 1 α -glicosintasa³¹. El possible motiu que impediria aplicar la glicosintasa a determinades glicosidases podria ser la hidròlisi catalitzada de l'acceptor activat amb més eficiència que no pas la transglicosidació per incorporació del donador; també podria ser que hi hagués altres possibles mecanismes de reacció que siguin incompatibles amb aquesta estratègia.

A la taula III.4 es mostren els resultats obtinguts d'eficiència i regioselectivitat de síntesi per a la Bgl3 actuant com a glicosintasa. Dels resultats obtinguts³² se'n conclou que l'enzim és molt eficient per a la síntesi de sucres. Una altra conclusió que s'extreu és de resultes que els productes de transglicosidació per glicosintasa són majoritàriament β 1 \rightarrow 3; tenint en compte que l'enzim hidrolitza millor substrats amb l'enllaç β 1 \rightarrow 4 (18% més actiu que sobre β 1 \rightarrow 3)³³ es conclou que les activitats glicosidasa de l'enzim wt i transglicosidasa del mutant sense nucleòfil no estan directament relacionades. Si es compara l'activitat glicosintasa amb l'activitat transglicosidasa s'observa que l'estereoselectivitat majoritària és comuna (β 1 \rightarrow 3) però els productes secundaris mostren diferències: per transglicosidació s'observa un elevat percentatge d'enllaços β 1 \rightarrow 2 en els productes³⁴, però no s'observa mitjançant la glicosintasa; en canvi sí que s'observa la síntesi de substrat β 1 \rightarrow 4 per glicosintasa mentre que és minoritari entre els productes de transglicosidació. Abans de la seva possible aplicació a escala industrial, alguns dels resultats obtinguts amb la glicosintasa requereixen més treball de base: la reacció entre α -glucosil-fluorur i pNPGlu ha produït en només algun experiment quantitats importants del glu- β -1-4-glu-O-pNP; a més, el rendiment de les reaccions preparatives ha resultat menor del que era esperat d'acord amb els resultats a escala analítica³⁵. Per tant hi ha algun aspecte a les condicions de reacció que no s'ha tingut en compte; probablement també l'estat de l'enzim, incloent les condicions d'expressió i purificació, i la puresa dels reactius contribueixen o condicionen els resultats.

²⁹ Koeller i Wong (2000) *Nat. Biotechnol.* 18, 835-841; Sears i Wong (2001) *Science* 291, 2344-2350; McAuliffe i Hindsgaul (1997) *Chem. Ind.*, 170-174.

³⁰ Mackenzie *et al* (1998) *JACS* 120, 5583-5584.

³¹ Malet i Planas (1998) *FEBS Letters* 440, 208-212; Trincone *et al* (2000) *Bioorg Med Chem Lett* 10, 365-368; Nashiru *et al* (2001) *Angew. Chem.* 40, 417-420; Okuyama (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 928-933.

³² Saura (2001) TFC. IQS. Barcelona; Conti (2001) TFC. IQS. Barcelona.

³³ Pérez-Pons *et al* (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1251, 145-153.

³⁴ Montero (1998) Tesis Doctoral. U. Complutense de Madrid. Madrid.

³⁵ Conti (2001) TFC. Institut Químic de Sarrià. Barcelona

Taula III.4. Ús de la Bgl3 com a glicosintasa.

Acceptator	Donador	Productes de reacció	Velocitat de reacció (%)	Rendiment 24h
F- α -Glu	Glu-pNP	Glu- β -1-3-glu-pNP	100	>99
	Gal-pNP	Glu- β -1-3-gal-pNP	4	87
	Xil-pNP	Glu- β -1-3-xyl-pNP i	0,7	57
		Glu- β -1-4-xyl-pNP	0,04	3
	Man-pNP	Glu- β -1-3-man-pNP	0,9	63
Fuc-pNP	Glu- β -1-3-fuc-pNP	0,04	13	
F- α -Gal	Glu-pNP	Gal- β -1-3-glu-pNP	100	>99
	Man-pNP	Gal- β -1-3-man-pNP	4	73
	Xil-pNP	Glu- β -1-3-xyl-pNP i	0,3	23
		Glu- β -1-4-xyl-pNP	0,05	5
Gal-pNP	Gal- β -1-3-gal-pNP	0,2	48	
F- α -Glu	Glu- β -1-4-glu-pNP	Glu- β -1-4-glu- β -1-4-glu-pNP	0,6	80
	Glu- β -1-3-glu-pNP	Glu- β -1-4-glu- β -1-3-glu-pNP	0,04	15
	Glu- β -1-3-xyl-pNP	no detectable		

La Cys-181 es troba situada al subseti +1 i per això tots els mutants a aquesta posició probablement presentaran diferents activitats respecte a l'extrem reductor del substrat; tant si es tracta d'un substrat que s'hidrolitza, com d'un sucre que fa d'acceptor en una reacció de transglicosidació. També és possible que variï l'especificitat de substrat utilitzant l'estratègia de la glicosintasa: un dels objectius actuals d'aquest camp és fer una base de dades d'especificitat i d'estereoselectivitat de gran varietat d'enzims per a tenir les millors eines per a cada aplicació. És per això que es proposa aprofitar la bateria de mutants existents per a fer estudis de transglicosidació, mitjançant la substitució del nucleòfil Glu-383 per Ala a cada mutant C181x; prèviament s'hauria de fer l'estudi d'especificitat per activitat glicosidasa, que tot i no estar directament relacionat podria orientar sobre l'activitat reversa. Les dades presentades són alhora d'interès per a treballs de glicosintasa per altres enzims de la família 1 tenint en compte que és una posició molt conservada. Una altra estratègia a seguir seria delimitar els mutants a estudiar en funció de les propietats del donador que es desitgi glicosilar. Aquests treballs s'estàn desenvolupant al laboratori del Dr. A. Planas, a l'Institut Químic de Sarrià.

IV. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1). S'ha desenvolupat un sistema d'expressió i purificació de la β -glucosidasa Bgl3 de *Streptomyces* en el sistema *Escherichia coli* BL21(DE3) - pET, que permet obtenir fins a 200 mg de proteïna purificada per litre de cultiu.

2). S'han identificat per mutagènesi dirigida els residus essencials per a la catàlisi de la Bgl3: Glu-383, que actua com a nucleòfil, i Glu-178 que ho fa com a catalitzador àcid/base general. El paper funcional d'aquests residus s'ha confirmat per rescat químic de l'activitat amb l'addició d'azida com a nucleòfil extern i identificació posterior de l'adducte format mitjançant RMN:

- amb el substrat activat 2,4-dinitrofenil-glucòsid el mutant E383A rendeix el producte α -glucosil azida.

- el mutant E178A rendeix el producte β -glucosil azida.

3). Per homologia de seqüència i per caracterització de l'activitat catalítica s'ha classificat la Bgl3 al principal subgrup de les β -glucosidases bacterianes de la família 1. L'enzim és semblantment actiu per substrats glucòsids i fucòsids, presenta una elevada K_M per a substrats galactòsids i molt baixa activitat per a substrats xilòsids. El perfil d'activitat respecte al pH i l'especificitat de substrat de la β -glucosidasa Bgl3 presenten certes variacions respecte a altres enzims semblants caracteritzats. Això seria reflex de les subtils diferències a l'estructura del centre actiu entre els enzims d'aquesta família.

4). S'ha avaluat mitjançant anàlisi de Hammett la relació de l'activitat de la Bgl3 ($\log k_{cat}$) per a diferents substrats aril-glucòsids respecte al pK_a del grup aril. La representació és bifàsica, amb el canvi situat a pK_a 8,5. Per valors de pK_a superiors a 8,5 hi ha una relació lineal amb pendent $\beta_{lg} = -0,7$. Per sota d'aquest valor el $\log(k_{cat})$ no varia amb el pK_a de l'aglicó. Aquesta relació bifàsica indica l'etapa limitant a la reacció: per a substrats amb bon grup sortint ($pK_a < 8,5$) és l'etapa de deglicosidació, mentre que per a substrats amb $pK_a > 8,5$ és la de glicosidació. El valor de la pendent indica a més que l'intermediari de reacció presenta una càrrega molt desenvolupada sobre el carboni anomèric.

5). S'ha analitzat el paper del residu Cys-181, situat a la cavitat del centre actiu, mitjançant caracterització cinètica de diferents mutants de Bgl3 obtinguts per substitució d'aquest residu.

Les constants catalítiques obtingudes per pNPG i cel·lobiosa per a totes les substitucions de la Cys-181 realitzades, indiquen que la seva funció és de reconeixement de l'extrem reductor del substrat principalment per interacció hidrofòbica:

- les substitucions de la Cys-181 per residus hidrofòbics provoquen reduccions importants de la K_M per al substrat pNPG.
- totes les substitucions fetes a la Cys-181 rendeixen enzims més inactius front cel·lobiosa, essent els més semblants al wt aquells amb substitucions per residus polars i hidrofòbics amb la cadena lateral de volum petit.

6). S'han obtingut cristalls de l'enzim Bgl3 que han permès la determinació de l'estructura tridimensional amb una resolució de fins a 1,69 Å. Les coordenades de l'estructura es troben a la base de dades del Protein Data Bank amb els codis 1GNX i 1GON.

V. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA¹

- Aguilar, Carlos F.; Sanderson, Ian; Moracci, Marco; Ciaramella, Maria; Nucci, Roberto; Rossi, Mosé i Pearl, Laurence H. (1997). Crystal Structure of the β -Glycosidase from the Hyperthermophilic Archeon *Sulfolobus solfataricus*: Resilience as a Key Factor in Thermostability. *Journal of Molecular Biology* 271 (5), 783-802. (1)
- Ausín, Cristina (1999). *Mecanisme enzimàtic d'una β -glucosidasa d'*Streptomyces*. Estudi d'activitat i anàlisi de Hammett comparativa de mutants en el centre actiu*. Treball fi de carrera dirigit per Antoni Planas. Institut Químic de Sarrià. Barcelona. (0, 4)
- Bairoch, Amos (1998). glycosid.txt (Glycosyl hydrolases in SWISS-PROT - Nomenclature and index of glycosyl hydrolases in SWISS-PROT). <<http://us.expasy.org/cgi-bin/lists?glycosid.txt>> (2002). (1)
- Barrett, Tracey; Suresh, C. G.; Tolley, Shirley P.; Dodson, E. J. i Hughes, Monica A. (1995). The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure* 3 (9), 951-960. (1, 2, 3)
- Bauer, Michael W. i Kelly, Robert M. (1998). The family 1 β -glucosidases from *Pyrococcus furiosus* and *Agrobacterium faecalis* share a common catalytic mechanism. *Biochemistry* 37 (49), 17170-17178. (0, 2, 4)
- Bradford, Marion M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (7 maig), 248-254. (1, 2, 3)
- Brameld, Ken A.; Shrader, William D.; Imperiali, Barbara i Goddard, William A. (1998). Substrate assistance in the mechanism of family 18 Chitinases: Theoretical studies of potential intermediates and inhibitors. *Journal of Molecular Biology* 280 (5), 913-923. (0)
- Burmeister, Wilhelm Pascal; Cottaz, Sylvain; Driguez, Hugues; Lori, Renato; Palmieri, Sandro i Henrissat, Bernard (1997). The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* 5 (5), 663-675. (0, 1, 3, 4)
- Burmeister, Wilhelm Pascal; Cottaz, Sylvain; Rollini, Patrick; Vasella, Andrea i Henrissat, Bernard (2000). High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (50), 39385-39393. (0)
- Buschiazzo, Alejandro; Tavares, Gisele A.; Campetella, Oscar; Spinelli, Silvia; Cremona, Marfa L.; París, Gastón; Amaya, Maria Fernanda; Frasch, Alberto C.C. i Alzari, Pedro M. (2000). Structural basis of sialyltransferase activity in trypanosomal sialidases. *The EMBO Journal* 19 (1), 16-24. (0)

¹ A l'enunciat de cada cita s'ha afegit un camp referent al capítol on s'han citat (0, 1, 2, 3, 4, per a la introducció, article 1, article 2, article 3 i discussió respectivament). El nou camp esta en paréntesi al final de la cita.

- Cedano, Juan (2000). Silmut Program. jcedano@ibb.uab.es. (4)
- Chitarra, Véronique; Souchon, Hélène; Spinelli, Silvia; Juy, Michel; Beguin, Pierre i Alzari, Pedro M. (1995) Multiple crystal forms of endoglucanase CelD: signal peptide residues modulate lattice formation. *Journal of Molecular Biology* 248 (2), 225-232. (1)
- Clarke, Jane i Fersht, Alan R. (1993). Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry* 32 (16), 4322-4329. (2)
- Conti, Marta (2001). *Actividad glicosintasa del mutante E383A de la β -glucosidasa de Streptomyces sp.. Parte II, Aceptores disac  ridos*. Treball fi de carrera dirigit per Antoni Planas. Institut Químic de Sarri  . Barcelona. (0, 4)
- Corbett, Kevin; Fordham-Skelton, Anthony P.; Gatehouse, John A. i Davis, Benjamin G. (2001). Tailoring the substrate specificity of the β -glycosidase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Letters* 509 (3), 355-360. (0)
- Cudney, Bob; Patel, Sam; Weisgraber, Karl; Newhouse, Yvonne i McPherson, Alexander (1994). Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Crystallographica Section D* 50 (4), 414-423. (1)
- Czjzek, Mirjam; Cicek, Muzaffer; Zamboni, Véronique; Burmeister, Wim P.; Bevan, David R.; Henrissat, Bernard i Esen, Asim (2001). Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) β -glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl- β -D-thioglucoside. *Biochemical Journal* 354 (1), 37-46. (3)
- Davies, Gideon J. i Henrissat, Bernard (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3 (9), 853-859. (0)
- Davies, Gideon J.; Wilson, Keith S. i Henrissat, Bernard (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal* 321 (2), 557-559. (0)
- Davies, Gideon J.; Sinnott, Michael L. and Withers, Stephen G. (1998). Glycosyl transfer. (Sinnott, Michael L., Ed.), in *Comprehensive Biological Catalysis: a mechanistic reference* (pg. 119-209). London: Academic Press Ltd. (2, 3)
- Dess, D.; Kleine, H. P.; Weinberg, D. V.; Kaufman, R. J.; Sidhu, R. S. (1981). Phase-transfer catalyzed synthesis of acetylated aryl β -D-glucopyranosides and aryl β -D-galactopyranosides. *Synthesis* 11, 883-885. (2)
- Detroy, R. W. i St Julian, G. (1983) Biomass conversion: Fermentation chemicals and fuels. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 10 (3), 203-228. (0)
- Fernández, Paloma; Ca  nada, Francisco Javier; Jiménez-Barbero, Jesús i Martín-Lomas, Manuel (1995). Substrate specificity of small-intestinal lactase: Study of the steric effects and hydrogen bonds involved in enzyme-substrate interaction. *Carbohydrate Ressearch* 271 (1), 31-42. (0, 3, 4)
- Ferrer, Mario (2001) *Estudio funcional del Glut  mico 437 de la β -glucosidasa Bgl3 de Streptomyces sp.. Treball experimental de magistratura*. Universitat Aut  noma de Barcelona. Barcelona. (4)

- Fersht, Alan R. (1988). Relationships between apparent binding energies measured in site-directed mutagenesis experiments and energetics of binding and catalysis. *Biochemistry* 27 (5), 1577-1580. (2)
- Frances, Bernard; Gout, Robert; Monsarrat, Bernard; Cros, Jean i Zajac, Jean-Marie (1992). Further evidence that morphine-6- β -glucuronide is a more potent opioid agonist than morphine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 262 (1), 25-31. (0)
- Gabelsberger, Josef; Liebl, Wolfgang i Schleifer, Karl-Heinz (1993). Cloning and characterization of β -galactoside and β -glucoside hydrolyzing enzymes of *Thermotoga maritima*. *FEMS Microbiology Letters* 109, 131-138. (2)
- Gill, Stanley C. i von Hippel, Peter H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* 182, 319-326. (2)
- Guasch, Alicia; Vallmitjana, Miquel; Pérez, Rosa; Querol, Enrique; Pérez-Pons, Josep A. i Coll, Miquel (1999) Cloning, overexpression, crystallization and preliminary X-ray analysis of a family 1 β -glucosidase from *Streptomyces*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 55 (3), 679-682. (2)
- Guo, Xumin; Laver, W. Graeme; Vimr, Eric i Sinnott, Michael L. (1994). Catalysis by two sialidases with the same protein fold but different stereochemical courses: A mechanistic comparison of the enzymes from Influenza A Virus and *Salmonella typhimurium*. *Journal of the American Chemical Society* 116 (13), 5572-5578. (0)
- Harhangi, Harry R.; Steenbakkens, Peter J. M.; Akhmanova, Anna; Jetten, Mike S. M.; van der Drift, Chris i Op den Camp, Huub J. M. (2002). A highly expressed family 1 L-glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. E2. *Biochimica et Biophysica Acta* 1574 (3), 293-303. (3)
- Heightman, Tom D. i Vasella, Andrea T. (1999). Recent Insights into Inhibition, Structure, and Mechanism of Configuration-Retaining Glycosidases. *Angewandte Chemie international edition in english* 38 (6), 750-770. (2, 4)
- Henrissat, Bernard i Bairoch, Amos (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 293 (3), 781-788. (2)
- Henrissat, Bernard i Davies, Gideon (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* 7 (5), 637-644. (1)
- Henrissat, Bernard; Coutinho, Pedro i Deleury, Emeline (2002). CAZY - Carbohydrate-Active enZymes. <<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>>. (0, 3)
- Jancarik, Jarmila i Kim, Sung-Hou (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography* 24 (4), 409-411. (1)
- Juncosa, Miquel; Pons, Jaume; Dot, Teresa; Querol, Enrique i Planas, Antoni (1994). Identification of active site carboxylic residues in *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase by site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (20), 14530-14535. (0, 2, 3, 4)

- Kempton, Julie B. i Withers, Stephen G. (1992). Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: Kinetic studies. *Biochemistry* 31 (41), 9961-9969. (0, 2, 4)
- Koeller, Kathryn M. i Wong, Chi-Huey (2000). Emerging themes in medicinal glycoscience. *Nature Biotechnology* 18 (8), 835-841. (4)
- Koshland, Daniel E. (1953) Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews* 28, 416-436. (2)
- Lawson, Sherry L.; Wakarchuk, Warren W. i Withers, Stephen G. (1997). Positioning the Acid/Base catalyst in a glycosidase: Studies with *Bacillus circulans* Xylanase. *Biochemistry* 36 (8), 2257-2265. (0)
- Leah, Robert; Kigel, Jaime; Svendsen, Ib i Mundy, John (1995). Biochemical and molecular characterization of a barley seed β -Glucosidase. *Journal of Biological Chemistry* 270 (26), 15789-15797. (0)
- Leisola, Matti; Jokela, Jouni; Pastinen, Ossi; Turunen, Ossi i Schoemaker, Hans (2001). *Industrial use of enzymes*. Helsinki: <http://www.w3.org/TR/REC-html40>. (0)
- Lin, Johnson; Pillay, Balakrishna i Singh, Suren (1999). Purification and biochemical characteristics of beta-D-glucosidase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 30 (1), 81-87. (3)
- Lusis, Aldons J. i Becker, Robert R. (1973). The β -glucosidase system of the thermophilic fungus *Chaetomium thermophile* var. coprophile. *Biochimica et Biophysica Acta* 329 (1), 5-16. (3)
- Ly, Hoa D. i Withers, Stephen G. (1999). Mutagenesis of glycosidases. *Annual Review of Biochemistry* 68, 487-522. (3)
- Mackenzie, Lloyd F.; Wang, Qingping; Warren, R. Antony J. i Withers, Stephen G. (1998). Glycosynthases: Mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* 120 (22), 5583-5584. (0, 4)
- MacLeod, Alasdair M.; Lindhorst, Thisbe; Withers, Stephen G. i Warren, R. Antony J. (1994). The acid/base catalyst in the exoglucanase/xylanase from *Cellulomonas fimi* is glutamic acid 127. Evidence from detailed kinetic studies of mutants. *Biochemistry* 33 (20), 6371-6376. (0, 2)
- Malet, Carles; Viladot, Josep Lluís; Ochoa, Ana; Gállego, Belen; Brosa, Carme i Planas, Antoni (1995). Synthesis of 4-methylumbelliferyl- β -D-glucan oligosaccharides as specific chromophoric substrates of (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -glucan 4-glucanohydrolases. *Carbohydrate Research* 274,285-301. (2)
- Malet, Carles i Planas, Antoni (1997). Mechanism of *Bacillus* 1,3-1,4- β -D-Glucan 4-glucanohydrolases: Kinetics and pH studies with 4-methylumbelliferyl- β -D-glucan oligosaccharides. *Biochemistry* 36 (45), 13838-13848. (0)
- Malet, Carles i Planas, Antoni (1998). From β -glucanase to β -glucansynthase: glycosyl transfer to a-glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. *FEBS Letters* 440, 208-212. (4)

- Marques, Ana Rita; Coutinho, Pedro M.; Videira, Paula; Fialho, Arsénio M. i Sá-Correia, Isabel (2003). *Sphingomonas paucimobilis* β -glucosidase Bgl1: a member of a new bacterial subfamily in glycoside hydrolase family 1. *Biochemical Journal* 370 (3), 793-804. (0, 3)
- Matthews, Brian W. (1968) Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology* 33 (2), 491-497. (1)
- McAuliffe, Joseph C. i Hindsgaul, Ole (1997). Carbohydrate drugs –an ongoing challenge. *Chem Ind*, 170-174. (4)
- McCarter, John D. i Withers, Stephen G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology* 4 (6), 885-892. (1, 2)
- McIntosh, Lawrence P.; Hand, Greg; Johnson, Philip E.; Joshi, Manish D.; Körner, Michael; Plesniak, Leigh A.; Ziser, Lothar; Wakarchuk, Warren W. i Withers, Stephen G. (1996). The pK_a of the general acid/base carboxyl group of a glycosidase cycles during catalysis: A ^{13}C -NMR study of *Bacillus circulans* xylanase. *Biochemistry* 35 (31), 9958-9966. (0, 4)
- McPherson, Alexander (1982). *The preparation and analysis of protein crystals*. New York: John Willey. (1)
- Montero, Esther; Alonso, Jose; Cañada, F. Javier; Fernández-Mayoralas, Alfonso i Martín-Lomas, Manuel (1997). Regioselectivity of the enzymatic transgalactosidation of D- and L- xylose catalysed by β -galactosidases. *Carbohydrate Research* 305 (3-4); 383-391. (3)
- Montero, Esther (1998). *Lactasa intestinal y otras glucosidasas: reacciones de hidrolisis y transglucosidación y estudio de la interacción enzima-sustrato por RMN*. Tesis Doctoral. Dpto. de Química Orgánica y Farmaceutica. Facultad de Farmàcia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. (0, 2, 4)
- Montero, Esther; Vallmitjana, Miquel; Pérez-Pons, Josep A.; Querol, Enrique; Jiménez-Barbero, Jesús i Cañada, F. Javier (1998). NMR studies of the conformation of thiocellobiose bound to a β -glucosidase from *Streptomyces* sp.. *FEBS Letters* 421 (3), 243-248. (2, 4)
- Moracci, Marco; Capalbo, Luisa; Ciaramella, Maria i Rossi, Mosé (1996) Identification of two glutamic acid residues essential for catalysis in the β -glycosidase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Protein Engineering* 9 (12), 1191-1195. (2, 4)
- Moracci, Marco; Trincone, Antonio; Perugino, Giuseppe; Ciaramella, Maria i Rossi, Mosé (1998). Restoration of the active-site mutants of the hyperthermophilic β -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*: Dependence of the mechanism on the action of external nucleophiles. *Biochemistry* 37 (49), 17262-17270. (2)
- Myneni, R. B.; Dong, J.; Tucker, C. J.; Kaufmann, R. K.; Kauppi, P. E.; Liski, J.; Zhou, L.; Alexeyev, V. and Hughes, K. (2001). A large carbon sink in the woody biomass of Northern forests, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 26, 14784-14789. (0)

- Nagano, Nozomi; Ota, Motonori i Nishikawa, Ken (1999). Strong hydrophobic nature of cysteine residues in proteins. *FEBS Letters* 458 (1), 69-71. (3)
- Namchuk, Mark N. i Withers, Stephen G. (1995). Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: Kinetic analysis of the role of noncovalent enzyme/substrate interactions. *Biochemistry* 34 (49), 16194-16202. (0, 2, 4)
- Namchuk, Mark N.; McCarter, John D.; Becalski, Adam; Andrews, Trevor i Withers, Stephen G. (2000). The role of sugar substituents in glycoside hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society* 122 (7), 1270-1277. (0)
- Nashiru, Oyekanmi; Zechel, David L.; Stoll, Dominik; Mohammadzadeh, Taraneh; Warren, R. Antony J. i Withers, Stephen G. (2001). β -Mannosynthase: Synthesis of β -Mannosides with a Mutant β -Mannosidase. *Angewandte Chemie international edition in english* 40 (2), 417-420. (4)
- Nucci, Roberto; Moracci, Marco; Vaccaro, Carlo; Vespa, Nunzia i Rossi, Mosé (1993). Exo-glucosidase activity and substrate specificity of the β -glycosidase isolated from the extreme thermophile *Sulfolobus solfataricus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 17 (2), 239-250. (2)
- Okuyama, Masayuki; Mori, Haruhide; Watanabe, Kotomi; Kimura, Atsuo i Chiba, Seiya (2002) α -glucosidase mutant catalyzes " α -glycosynthase"-type reaction. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 66 (4). 928-933. (4)
- Otwinowski, Zbyszek (1993). *Proceedings of the CCP4 Study Weekend* (L. Sawyer, N. Isaacs i S. Bailey, editor) pp. 56-62. Warrington: Daresbury Laboratory. (1)
- Patchett, Mark L.; Daniel, Roy M. i Morgan, Hugh W. (1987). Purification and properties of a stable β -glucosidase from an extremely thermophilic anaerobic bacterium. *Biochemical Journal* 243 (3), 779-787. (3)
- Painbeni, Eric; Vallés, Salvador; Polaina, Julio i Flors, Agustí (1992). Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* β -glucosidase expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 174 (9), 3087-3091. (2)
- Paul, Dennis; Standifer, Kelly M.; Inturrisi, Charles E. i Pasternak, Gavril W. (1989). Pharmacological characterization of morphine-6- β -glucuronide, a very potent morphine metabolite. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 251 (2), 477-483. (0)
- Pérez-Pons, Josep A (1991). *El sistema β -glucosidasa de Streptomyces sp. QM-B814: proteínas y genes*. Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. (4)
- Pérez-Pons, Josep A.; Cayetano, Antonio; Rebordosa, Xavier; Lloberas, Jorge; Guasch, Alicia i Querol, Enrique (1994). A β -glucosidase gene (bgl3) from *Streptomyces* sp. strain QM-B814. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and characterization of the encoded enzyme, a new member of family 1 glycosyl hydrolases. *European Journal of Biochemistry* 223 (2), 557-565. (0, 1, 2, 3)

- Pérez-Pons, Josep A.; Rebordosa, Xavier i Querol, Enrique (1995). Properties of a novel glucose-enhanced β -glucosidase purified from *Streptomyces* sp. (ATCC 11238). *Biochimica et Biophysica Acta* 1251 (2), 145-153. (0, 4)
- Pérez-Pons, Josep A.; Padros, Esteve i Querol, Enrique (1995). Prediction and Fourier-transform infrared-spectroscopy estimation of the secondary structure of a recombinant β -glucosidase from *Streptomyces* sp. (ATCC 11238). *Biochemical Journal* 308 (3), 791-794. (2)
- Planas, Antoni (1998). (Claeyssens, M., Nerinckx, W., and Piens, K., Eds.) in *Carbohydrases from Trichoderma reesei and other microorganisms* (pg 21-38). Cambridge: The Royal Society of Chemistry. (2)
- Planell, Raquel (2001). *Implicación del "lazo C" en la estructura y función de la β -glucosidasa Bgl3 de Streptomyces sp. Qm-B814 (ATCC 11238)*. Treball experimental de magistratura. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. (4)
- Pons, Jaume; Planas, Antoni i Querol, Enrique (1995). Contribution of a disulfide bridge to the stability of 1,3-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase from *Bacillus licheniformis*. *Protein Engineering* 8 (9), 939-945. (2)
- Rau, Astrid; Hogg, Tanis; Marquardt, Rüdiger i Hilgenfeld, Rolf (2001). A new lysozyme fold. Crystal structure of the muramidase from *Streptomyces coelicolor* at 1.65 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry* 276 (34), 31994-31999. (0)
- Redenbach, Matthias; Kieser, Helen M.; Denapaite, D.; Eichner, A.; Cullum, J.; Kinashi, H. i Hopwood, David A. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Molecular Microbiology* 21 (1), 77-96. (0)
- Richard, John P; Huber, Reuben E.; Lin, Sue; Heo, Christine i Amyes, Tina L. (1996). Structure-reactivity relationships for β -galactosidase (*Escherichia coli*, lac Z). 3. Evidence that Glu-461 participates in Brønsted acid-base catalysis of β -D-galactopyranosyl group transfer. *Biochemistry* 35 (38), 12377-12386. (2)
- Rivera-Sagredo, Alfonso; Nieto, O.; Jiménez-Barbero, Jesús i Martín-Lomas, Manuel (1992). Substrate specificity of small-intestinal lactase. Assessment of the role of the substrate hydroxyl groups. *European Journal of Biochemistry* 209 (1), 415-422. (4)
- Sambrook, Joseph; Fritsch, E. F. i Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1, 2)
- Sanz-Aparicio, Juliana; Hermoso, Juan A.; Martínez-Ripoll, Martín; Lequerica, Juan Luís i Polaina, Julio (1998). Crystal structure of β -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: Insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. *Journal of Molecular Biology* 275 (3), 491-502. (1, 4)
- Saura, Marc (2001). *Activitat glicosintasa del mutant E383A de la β -glucosidasa d'*Streptomyces* sp., part I: Acceptors monosacàrids*. Treball fi de carrera dirigit per Antoni Planas. Institut Químic de Sarrià. Barcelona. (0, 4)

- Sears, Pamela i Wong, Chi-Huey (2001). Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins. Review. *Science* 291 (5512), 2344-2350. (4)
- Sharma, Sunil K.; Corrales, Guillermo i Penadés, Soledad (1995). Single step stereoselective synthesis of unprotected 2,4-dinitrophenyl glycosides. *Tetrahedron Letters* 36 (31), 5627-5630. (2)
- Sidhu, Gary; Withers, Stephen G.; Nguyen, Nham T.; McIntosh, Lawrence P.; Ziser, Lothar i Brayer, Gary D. (1999). Sugar ring distortion in the glycosyl-enzyme intermediate of a family G/11 xylanase. *Biochemistry* 38 (17), 5346-5354. (4)
- Sinnott, Michael L. i Souchart, I. J. (1973). The mechanism of action of β -galactosidase: Effect of aglycone nature and deuterium substitution on the hydrolysis of aryl galactosides. *Biochemical Journal* 133 (1), 89-98. (0)
- Sinnott, Michael L. (1990). Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chemical Reviews* 90, 1171-1202. (0, 2, 3)
- Street, Ian P.; Kempton, Julie B. i Withers, Stephen G. (1992). Inactivation of a β -glucosidase through the accumulation of a stable 2-deoxy-2-fluoro- α -D-glucopyranosyl-enzyme intermediate: a detailed investigation. *Biochemistry* 31 (41), 9970-9978. (2)
- Tenkanen, Maija; Heikinheimo, Lea i Buchert, Johanna (1999). Enzymes for fibres, fabrics and factories. *Industrial Horizons*, 6-8. (0)
- Toney, Michael D. i Kirsch, Jack F. (1992). Brønsted analysis of aspartate aminotransferase via exogenous catalysis of reactions of an inactive mutant. *Protein Science* 1 (1), 107-119. (0)
- Toone, Eric J.; Simon, Ethan S.; Bednarski, Mark D. i Whitesides, George M. (1989). Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Tetrahedron* 45 (17), 5365-5422. (0)
- Trimbur, Donald E.; Warren, R. Antony J. i Withers, Stephen G. (1992). Region-directed mutagenesis surrounding the active site nucleophile in β -glucosidase from *Agrobacterium faecalis*. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (15), 10248-10251. (2)
- Trincone, Antonio; Perugino, Giuseppe; Rossi, Mosé i Moracci, Marco (2000). A novel thermophilic glycosynthase that effects branching glycosylation. *Bioorg Med Chem Lett* 10 (4), 365-368. (4)
- Tull, Dedreia i Withers, Stephen G. (1994). Mechanisms of cellulases and xylanases: a detailed kinetic study of the exo- β -1,4-glycanase from *Cellulomonas fimi*. *Biochemistry* 33 (20), 6363-6370. (0)
- Vallmitjana, Miquel (1995). *Expressió heteròloga de la β -glucosidasa Bgl3 de Streptomyces sp. QM-B814 (ATCC 11238) en E. coli*. Treball experimental de magistratura. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. (4)
- Vallmitjana, Miquel; Ferrer-Navarro, Mario; Planell, Raquel; Abel, Mireia; Ausín, Cristina; Querol, Enrique; Planas, Antoni i Pérez-Pons, Josep A. (2001). Mechanism of the family 1 β -glucosidase from *Streptomyces* sp: catalytic residues and kinetic studies. *Biochemistry* 40 (20), 5975-5982. (3)

- Viikari, Liisa; Buchert, Johanna i Suurnäkki, Anna (1998). Enzymes in pulp bleaching. (Bruce, Alan i Palfreyman, John W., Ed.), in *Forest product biotechnology* (pg. 83–97). London: Taylor & Francis Ltd. (0)
- Viladot, Josep-Lluís; de Ramon, Elisabet; Durany, Olga i Planas, Antoni (1998). Probing the mechanism of Bacillus 1,3-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolases by chemical rescue of inactive mutants at catalytically essential residues. *Biochemistry* 37 (32), 11332-11342. (0, 2)
- Wang, Qingping; Graham, R. W.; Trimbur, Donald; Warren, R. Antony J. i Withers, Stephen G. (1994). Changing enzymatic reaction mechanisms by mutagenesis: Conversion of a retaining glucosidase to an inverting enzyme. *Journal of the American Chemical Society* 116 (25), 11594-11595. (2)
- Wang, Qingping; Trimbur, Donald; Graham, R.; Warren, R. Antony J. i Withers, Stephen G. (1995). Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium faecalis* β -glucosidase by kinetic analysis of mutants. *Biochemistry* 34 (44), 14554-14562. (0, 2, 4)
- White, André i Rose, David R. (1997). Mechanism of catalysis by retaining β -glycosyl hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* 7 (5), 645-651. (0, 1)
- Wiesmann, Christian; Beste, Gerald; Hengstenberg, Wolfgang i Schulz, Georg E. (1995) The three-dimensional structure of 6-phospho- β -galactosidase from *Lactococcus lactis*. *Structure* 3 (9), 961-968. (0, 1)
- Wiesmann, Christian; Hengstenberg, Wolfgang i Schulz, Georg E. (1997). Crystal structures and mechanism of 6-phospho- β -galactosidase from *Lactococcus lactis*. *Journal of Molecular Biology* 269 (5), 851-860. (0, 3)
- Williams, S. J.; Mark, B. L.; Vocadlo, D. J.; James, M. N.; Withers, S.G. (2002) Aspartate 313 in the *Streptomyces plicatus* hexosaminidase plays a critical role in substrate-assisted catalysis by orienting the 2-acetamido group and stabilizing the transition state. *Journal of Biological Chemistry* 277 (42), 40055-40065. (0)
- Withers, Stephen G. i Street, Ian P. (1988). Identification of a covalent α -D-glucopyranosyl enzyme intermediate formed on a β -glucosidase. *Journal of the American Chemical Society* 110 (25), 8551-8553. (0)
- Withers, Stephen G.; Warren, R. Antony J.; Street, Ian P.; Rupitz, Karen; Kempton, Julie B. i Aebersold, Ruedi (1990). Unequivocal demonstration of the involvement of a glutamate residue as a nucleophile in the mechanism of a "retaining" glycosidase. *Journal of the American Chemical Society* 112 (15), 5887-5889. (0, 2, 4)
- Withers, Stephen G.; Rupitz, Karen; Trimbur, Donald i Warren, R. Antony J. (1992). Mechanistic consequences of mutation of the active site nucleophile glu 358 in *Agrobacterium* β -glucosidase. *Biochemistry* 31 (41), 9979-9985. (0, 4)
- Withers, Stephen G. (1995). (Petersen, S. B., Svensson, B., and Pedersen, S., Eds.), in *Carbohydrate Bioengineering* (pag. 97-111). Amsterdam: Elsevier. (2)

- Withers, Stephen G. i Aebersold, Ruedi (1995). Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases. *Protein Science* 4 (3), 361-372. (0)
- Wolfenden, Richard; Lu, Xiangdong i Young, Gregory (1998). Spontaneous hydrolysis of glycosides. *Journal of the American Chemical Society* 120 (27), 6814-6815. (0)
- Zechel, David L. i Withers, Stephen G (2000). Glycosidase mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst. *Accounts of Chemical Research* 33 (1), 11-18. (4)
- Zouhar, Jan; Vevodova, Jitka; Marek, Jaromír; Damborsky, Jiri; Su, Xiao-Dong i Brzobohaty, Bretislav (2001). Insights into the functional architecture of the catalytic center of a maize β -glucosidase Zm-p60.1. *Plant Physiology* 127 (3), 973-985. (4)

VI. ANNEX

NMR studies of the conformation of thiocellobiose bound to a β -glucosidase from *Streptomyces* sp.

Esther Montero^a, Miquel Vallmitjana^b, Josep A. Pérez-Pons^b, Enrique Querol^b,
Jesús Jiménez-Barbero^a, F. Javier Cañada^{a,*}

^aInstituto de Química Orgánica, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

^bInstitut de Biologia Fonamental "Vicent Villar I Palasi", Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 17 November 1997; revised version received 15 December 1997

Abstract The conformation of 4-thiocellobiose bound to β -glucosidase from *Streptomyces* sp. has been studied by ¹H-NMR transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy (TR-NOE). Thiocellobiose behaves as an inhibitor of this glucosidase when cellobiose is used as substrate. NOE measurements and molecular mechanics calculations have also been performed to estimate the probability distribution of conformers of thiocellobiose when free in solution. Experimental data show that, in contrast with the natural O-analogue, thiocellobiose presents three conformational families in the free state, namely *syn*, *anti-Ψ* and *anti-Φ*, whilst only one of them (*syn*) is recognized by the enzyme.

© 1998 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Transferred NOE spectroscopy; Molecular mechanics calculation; Thiocellobiose; β -glucosidase; *Streptomyces* sp.

1. Introduction

The recognition events among biomolecules are strongly dependent on the three-dimensional shape of the interacting species. The study, at the atomic level, of protein-carbohydrate interactions has become a topic of interest during the last few years [1]. When carbohydrates interact with other biomolecules, it is important to consider that the accessible conformational space around the glycosidic linkages can confer significant flexibility to oligosaccharide structures that can be translated into adaptability within the receptor binding site [2]. Several 3D structures of protein-oligosaccharide complexes have been determined by X-ray crystallography [1–4] and NMR [2,5]. In this context, transferred nuclear Overhauser experiments have been used to obtain information regarding the bound conformation of an oligosaccharide within a protein binding site, which can be compared to that existing in solution [6,7]. This approach is currently employed to study oligosaccharide conformations in several lectin-carbohydrate complexes. Interestingly, these studies have shown that the bound conformation may be either similar to the major one existing in solution or strikingly different to that one [2,8,9].

In the case of oligosaccharide-transforming enzymes, the corresponding interaction between the carbohydrate and the protein is a dynamic process. The substrate is transformed into products and significant structural changes on the substrate molecule are expected to occur along the reaction pathway even at the initial recognition step. In this context, gly-

cosidase enzymes (those that hydrolyze glycosides and oligo- and polysaccharides) have been classified in more than sixty families in base of their sequence homology [10]. The members within a family, along with homology, share similar mechanistic and structural characteristics that are different to those of other glycosidase families [4,11]. At this time there is not much information on how the oligosaccharide substrates are recognized by their appropriate glycosidase. Within this class of enzymes, with the exception of some special cases [12], neither X-ray crystallography nor NMR spectroscopy can be applied directly to analyze substrate-enzyme complexes since the substrate is quickly transformed into products. However, it is possible to extract relevant information from the study of enzyme-inhibitor complexes complemented with some sort of molecular modeling. In fact, several structures of glycosidase-inhibitor or glycosidase-product complexes have been resolved [3,13] and some conformational changes on the saccharide substrate have been predicted to take place upon enzyme binding [14]. This strategy can also be approached using TR-NOE experiments and in fact it has been recently applied in our laboratory to the study of *Escherichia coli* β -galactosidase when complexed with C-lactose [15], a substrate analogue resistant to hydrolysis.

Here we report on the determination of the bound conformation of thiocellobiose, an analogue of cellobiose, within the active site of a β -glucosidase (Bgl3) from *Streptomyces* sp. [16]. The Bgl3 enzyme is a retaining glycosidase showing an exo-like action pattern by releasing glucose units from the non-reducing end of cellooligosaccharides, and it has been classified into the family 1 glycosyl hydrolases [10], upon sequence similarity analysis. TR-NOE experiments have been performed with this aim. Thiosaccharides have been reported to be competitive inhibitors of glycosidases, in accordance with the expected structural resemblance of the corresponding saccharide substrate [17]. In fact, the structure of a thiosaccharide complexed with a glycosidase has been recently solved and used for the study of substrate binding and catalysis [14]. Conformational studies of thiosaccharides are scarce [18–20], and as a first step, it has been necessary to analyse the conformational behaviour of thiocellobiose in solution in order to be compared to that adopted by its O-analogue (cellobiose) [21,22] and to the target glucosidase-bound conformation.

2. Materials and methods

Thiocellobiose was purchased from Toronto Research Chemicals Inc.

Recombinant Bgl3 glucosidase was obtained from cultures of *E. coli* BL21(DE3) carrying the plasmid pET21-HBG3, a pET-21d(+) (Novagen) derivative in which a His-Tag coding sequence was fused to the

*Corresponding author. Fax: +34 (1) 5644853.
E-mail: iqocv69@fresno.csic.es

start codon (GTG) of Bgl3 reading frame yielding a protein with an extended N-terminal formed by the sequence MHHHHHHGIIH and a deduced molecular mass of 53.6 kDa. For protein purification cell-free extracts of the recombinant strain were obtained and applied onto a 5 ml HiTrap Chelating Sepharose (Pharmacia) column previously charged with Ni^{2+} as a metal ion. Cell extract preparation and chromatography were carried out essentially according to the manufacturer's specifications. Bgl3-containing fractions were pooled, concentrated and desalted by ultrafiltration at 4°C using 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, as desalting buffer. Following this procedure an homogeneous enzyme sample was obtained, as judged by SDS-PAGE [23] and Coomassie brilliant blue R-250 staining. Protein concentration was determined by the dye binding method of Bradford [24], using BSA as standard. The pure enzyme was kept at 4°C for short periods or stored at -20°C in the presence of 45% glycerol for prolonged periods.

2.0.1. K_m measurement. Solutions of varying concentration of cellobiose (0–90 mM) were incubated with the β -glucosidase from *Streptomyces* sp. (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$), in sodium phosphate buffer 50 mM (50 μl , pH = 6.5) at 37°C for 30 min. The release of glucose from cellobiose was determined using the glucose reagent Trinder (SIGMA): following the manufacturer's protocol, after 10 min incubation with the reagent, the absorbance at 505 nm was measured. The intensity of the color produced is directly proportional to the glucose concentration in the sample. Data were fitted to a Michaelis Menten curve, giving a K_m of 1.4 mM.

2.0.2. Inhibition assay. The enzyme (16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated in sodium phosphate buffer (50 mM, pH = 6.5) at 37°C for 30 min, with cellobiose (1 mM) as substrate, and different concentrations (0–12 mM) of inhibitor (thiocellobiose). The release of glucose from cellobiose was determined as before. Kinetic data were adjusted to a competitive inhibition model, giving a K_i of 6.0 mM.

2.1. Conformational calculations. Molecular mechanics

Glycosidic torsion angles are defined as ϕ H-1'-C-1'-S-C-4 and ψ C-1'-S-C-4-H-4 for thiocellobiose. Relaxed (ϕ , ψ) potential energy maps were calculated using MM2* and AMBER* force fields as integrated in MACROMODEL 4.5 [25], with dielectric constant $\epsilon = 80$.

All calculations were made for the β anomer of thiocellobiose, assuming that there is not a great conformational difference between α and β reducing end anomers for 1→4 linked disaccharides [21]. Four initial geometries were considered, gggg, gggt, gtgg and gtgt, obtained by combining the positions gg and gt for the primary alcohol group of both glucose moieties. Gauche-gauche and gauche-trans rotamers are defined by the ω torsion angle (O5-C5-C6-O6), as -60 or +60°, respectively. The first two characters correspond to the non-reducing glucose moiety, and the other two to the reducing one. The starting positions for the secondary hydroxyl groups were clockwise

for both residues. Four relaxed energy maps were obtained following a similar protocol to that described previously [26]. Adiabatic surfaces were built, and the probability distributions calculated for each ϕ , ψ point according to a Boltzmann function.

2.2. NMR experiments

NMR spectra of thiocellobiose were recorded at 299 K in D_2O , using Varian Inova 400 MHz and Varian Unity 500 MHz spectrometers. Proton chemical shifts were referenced to residual HDO at δ 4.76. COSY and TOCSY spectra permitted the assignment of the proton spin systems. 2D NOESY spectra for the free disaccharide were acquired at 700 and 900 ms.

2.3. NOE calculations

NOESY spectra were simulated according to a complete relaxation matrix approach, following the protocol previously described [26], using two different mixing times (700 and 900 ms). The spectra were simulated from the average distances $\langle r^{-6} \rangle_{\text{kl}}$ calculated from the relaxed energy maps at 299 K. Isotropic motion and external relaxation of 0.1 s^{-1} were assumed. A τ_c of 55 ps was used to obtain the best match between experimental and calculated NOEs for the H-2/H-4 proton pair.

All the NOE calculations were automatically performed by a home made program, available from the authors upon request [26].

2.4. TR-NOESY experiments

β -glucosidase samples were concentrated after repeated cycles of exchange with 50 mM deuterated sodium phosphate containing NaCl (100 mM), in microconcentrators (Centricon p10), and transferred to the NMR tube to give a final pH of 6.5, uncorrected for isotope effects. The final concentration of the enzyme in the NMR tube was 0.1 mM. The regular NOESY sequence was used with mixing times of 250, 350 and 450 ms for a 17:1 molar ratio of thiocellobiose/enzyme at 299 and 303 K. Line broadening of the sugar protons was monitored after the addition of the ligand in order to detect binding.

3. Results and discussion

3.1. Conformational analysis

3.1.1. Molecular mechanics calculations. The structure of 4-thiocellobiose with the atomic numbering is shown in Fig. 1. Torsional angles around the glycosidic linkage are defined as ϕ H-1'-C-1'-S-C-4 and ψ C-1'-S-C-4-H-4. Fig. 2 shows the adiabatic surfaces built from the respective relaxed energy

Table 1
Steric energy values and populations of the low energy regions of thiocellobiose

Min	AMBER			MM2		
	ϕ , ψ	Pop. (%)	E (kJ/mol)	ϕ , ψ	Pop. (%)	E (kJ/mol)
<i>syn</i>	55.1, -11.7	29	40.52	56.8, -7.6	43	94.70
<i>anti-ψ</i>	45.0, 175.5	54	36.73	34.0, 171.3	29	93.52
<i>anti-ϕ</i>	172.8, -2.4	15	38.23	171.6, 1.7	26	93.27

Table 2
Experimental and calculated normalized NOESY intensities (%) for thiocellobiose at 26°C in D_2O solution, at 400 MHz

Proton	Mixing time 700 ms			Mixing time 900 ms		
	Exp	AMBER	MM2	Exp	AMBER	MM2
H-2-H-1	1.3	1.1	1.0	1.6	1.4	1.2
H-2-H-4	3.3	3.8	3.2	4.8	4.8	4.0
H-3-H-1'	2.9	3.8	2.3	3.4	4.8	2.8
H-3-H-5	2.6	3.2	2.6	4.0	4.0	3.2
H-3-H-2	1.9	1.3	1.2	2.0	1.7	1.5
H-3-H-4	1.0	1.2	1.0	1.4	1.6	1.3
H-4-H-1'	2.7	1.4	1.9	3.6	1.7	2.4
H-2'-H-4	n.d.	1.0	1.7	0.7	1.2	2.2

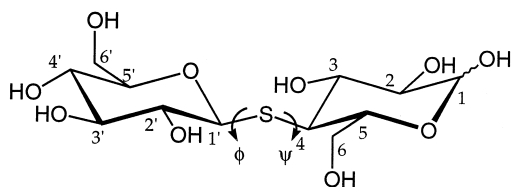


Fig. 1. View of thiocellobiose (1) showing the atomic numbering and the interglycosidic torsional angles (ϕ , ψ).

maps for MM2* and AMBER* force fields, using $\epsilon = 80$, with the isoenergy contours drawn every 2 kcal/mol. Both force fields predict three low energy regions, similar to that obtained for the natural compound, cellobiose, using the regular MM3 force field at $\epsilon = 4$ [21]. The geometries of the three minima are very similar for both force fields, with minor differences around the glycosidic linkages (Table 1, Fig. 3), and are in accordance with the exo-anomeric effect [27]. They predict, however, different global minima, and rather distinct population distributions. Using MM2*, the most populated region is that corresponding to the central minimum (*syn*, ϕ , $\psi = 56.8$, -7.6) although the global minimum is the *anti- Φ* conformer (ϕ , $\psi = 171.6$, 1.7). AMBER* locates the most populated region around the global minimum, in this case the so-called *anti- Ψ* conformer [28] (ϕ , $\psi = 45.0$, 175.5).

There are proton-proton short distances which give characteristic NOEs which are exclusive for each one of the three different regions of the conformational map. Consequently, these NOE intensities will be sensitive to their respective populations. For thiocellobiose, these exclusive NOEs are H-4-H-1', H-3-H-1' and H-2'-H-4 for the *syn*, *anti- Ψ* and *anti- Φ* conformations, respectively. Therefore, the existence of the different conformational families, in solution or in the bound state, could be detected by the presence of these NOEs. Fig. 4 shows the relevant interresidue proton distances for 1, superimposed on the probability distribution maps.

3.1.2. NMR results. Measurements of nuclear Overhauser enhancements were made and subsequently compared to the previous calculations. The important problem of overlapping among H-3, H-4 and H-5 nuclei, normally present in cellobiose and lactose related disaccharides, is partly solved here due to the nuclear shielding of H-4 produced by the presence of the sulfur atom. Experimental NOEs, compared to those calculated are collected in Table 2. MM2* and AMBER* force fields give a H-4-H-1' NOE smaller than the experimental one, which probably means that the actual population around minimum *syn* is larger than that calculated, 43% (MM2*) and 29% (AMBER*). The H-3-H-1' intensity is

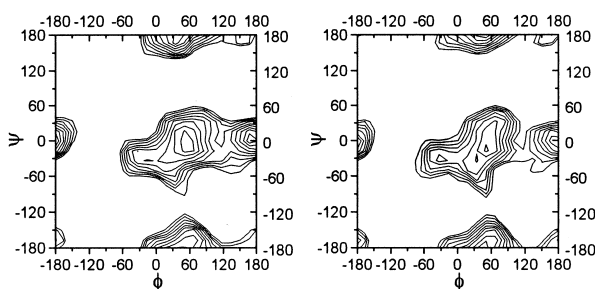


Fig. 2. Comparison of the adiabatic maps calculated by using MM2* (left) and AMBER* (right) force fields.

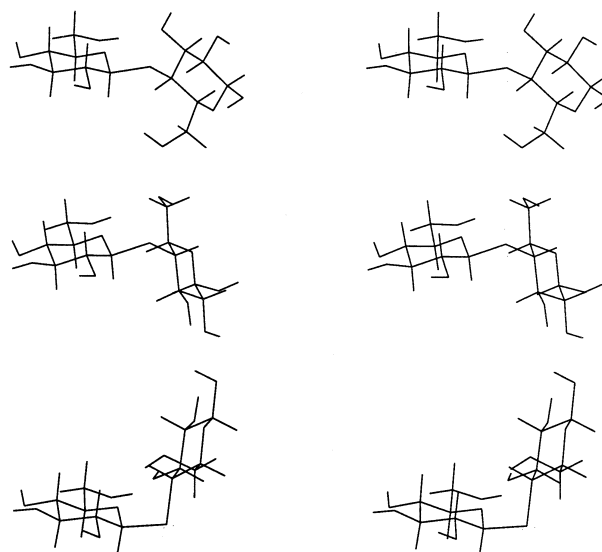


Fig. 3. Stereo view of the major minima of 1 calculated by AMBER*. From top to bottom, conformers *syn*, *anti- Ψ* and *anti- Φ* .

well reproduced by MM2* whereas AMBER* predicts a larger value for it. On the other hand, AMBER* predicts correctly the H-2'-H-4 NOE and MM2* overestimates it. Taking into account all these data, the experimental NOEs could be explained by a population distribution of about 55%, 30% and 15% of *syn*, *anti- Ψ* and *anti- Φ* conformers, respectively. On the other hand, the conformation of the natural compound in solution, cellobiose, may be described in more than 95% by one minimum energy region around the *syn* conformation that is also found in the crystal structures of β -cellobiose, methyl β -cellobioside and cellulose I and II [21,22].

3.2. TR-NOESY experiments

Transferred nuclear Overhauser enhancement (TR-NOE) experiments have been proved to be a useful tool to determine the conformation of the protein-bound ligands. It is being largely used for the study of oligosaccharides bound to lectins and antibodies. In general, it can be applied to those ligands which exchange at relative fast rate between the free and the bound state. The conditions are $K_{-1} \gg \sigma^B$ and $p_b \sigma^B > p_f \sigma^F$, where K_{-1} is the off-rate constant, σ^B and σ^F are the cross relaxation rates for the bound and free ligand, and p_b and p_f are the fractions of bound and free ligand, respectively. NOEs between bound oligosaccharide protons appear strong and negative, as expected for molecules in the slow motion regime.

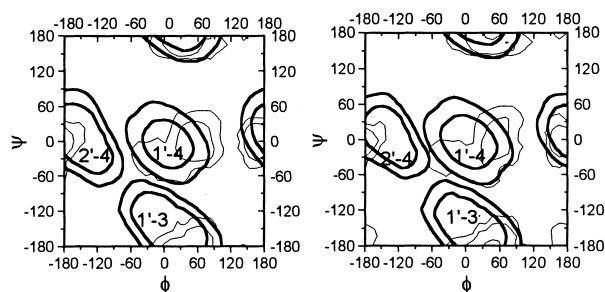


Fig. 4. Superimposition of the relevant proton-proton short distances on the probability maps determined for 1 using MM2* (left) and AMBER* (right) force fields.

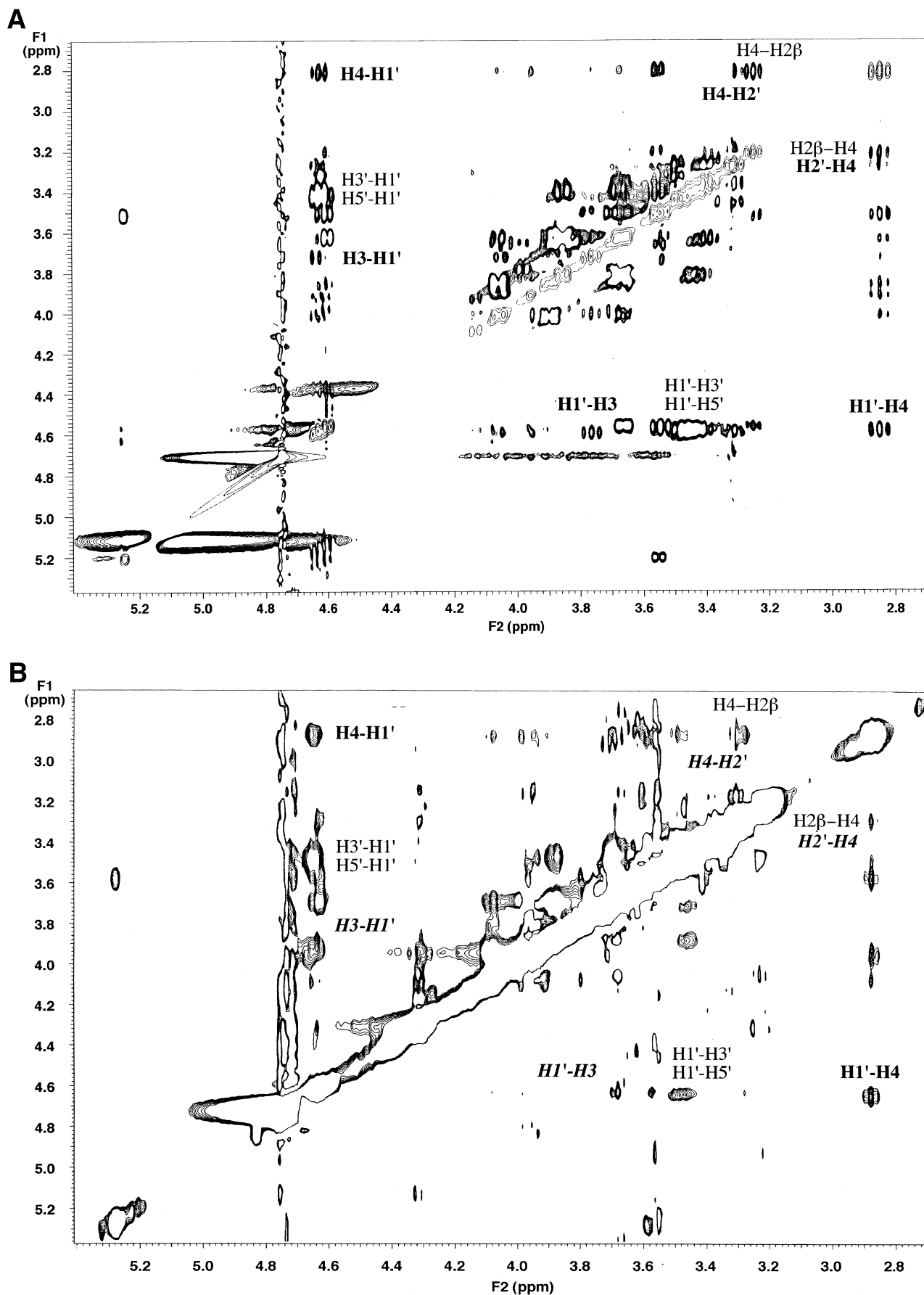


Fig. 5. NOESY ^1H -NMR spectra of **1** in the absence (A) and in the presence (B) of β -glucosidase, acquired at 900 and 250 ms respectively. Relevant NOEs are labeled: Exclusive NOEs are indicated in bold. Labels in italics indicate absence of NOE.

The ability of thiocellobiose for the inhibition of β -glucosidase was firstly tested through kinetic measurements (see Section 2), in order to have an idea of its association capacity. The measured K_i was 6.0 mM for a competitive inhibition model. TR-NOESY experiments recorded at different mixing times showed important differences compared to those obtained for the free sugar (Fig. 5). The H-3-H-1' and H-2'-H-4 NOEs, that characterize the *anti*- Ψ and *anti*- Φ conformers of thiocellobiose in solution, are not present in the spectrum of the complex. The only exclusive NOE observed is the H-4-H-1' NOE, indicating that the *syn* conformation is the only one recognized by the enzyme. Therefore, β -glucosidase from *Streptomyces* sp., selects only one conformation of those present in free solution. In fact, the bound conformation corresponds to the major conformation of thiocellobiose in solution, which also turns to be the global minimum of the natural compound, cellobiose. The interaction between thiocellobiose and this β -glucosidase does not force the inhibitor molecule to make significant conformational changes. In addition, deformations of the pyrenoid rings are not observed either, since the Gal H-1/H-5 and H-1/H-3 NOE cross peaks which define the 4C_1 chair conformation are fairly strong. However, it has been reported using X-ray crystallography that *Fusarium Oxysporum* endoglucanase I (a retaining glycosidase from family 7) complexed with a thiooligosaccharide substrate analogue, provokes a conformational variation of the pyrenoid ring at the point of cleavage. In fact, the regular 4C_1 chair is distorted towards a twist boat form that positions the leaving group in a quasi-axial orientation, thus facilitating the breaking of the glycosidic bond [14]. A similar conformational change on the substrate molecule upon binding has been proposed for myrosinase, a family 1 enzyme that is able to hydrolyse thioglycosides. In this case, the conclusions were based on the structure solved for a covalent glycosyl-enzyme reaction intermediate [29] complemented with molecular modeling. Although the recognition of glycosides in distorted conformations (half chair or skew boat) was early proposed to facilitate the action of glycosidases [30], still it is an open question up to what extent such deformation is a necessary initial step in the reaction pathway [31]. In fact, other different conformational changes of the glycoside have been proposed to occur upon substrate binding to glycosidases. For example, for a family 8 glucanase [13], a conformation of the substrate molecule with Φ close to 180° around the scissile glycosidic bond has been invoked to exist, based upon the structure of the enzyme product. A similar torsional angle has been observed by using TR-NOE experiments for C-lactose, a non-hydrolyzable substrate analogue [15], in its complex with *E. coli* β -galactosidase (from family 2).

In conclusion, *Streptomyces* β -glucosidase (family 1), differs of the other mentioned glycosidases since it selects a conformation of thiocellobiose which is similar to the most populated one of the natural substrate in solution. The selection by a protein of only one conformer of those present in the free state for oligosaccharide molecules has also been reported by us and by others. In fact, we have shown that in some cases the protein binding site provides a perfect arrangement to accommodate only one of these three conformational regions. On the other hand, the entropy penalty for the recognition of only one conformer is probably high and its implications for enzyme inhibitor design should also be considered. The inhibition constant estimated for thiocellobiose against the β -glu-

cosidase ($K_i = 6.0$ mM) was higher than the K_m obtained for cellobiose (1.4 mM), under the same experimental conditions, thus indicating a lower affinity for the thioanalogue than for the substrate. When the 3D structure of this β -glucosidase becomes available (the X-ray determination of the structure is actually in progress, J.A. Perez-Pons, personal communication) it will be possible to perform molecular modeling studies of the inhibitor within the active site of the enzyme, as it has been done for other enzymes [32,33,15]. This modeling will give some insights whether or not the substrate analogue, in the observed *syn* conformation, can be easily accommodated at the enzyme binding site, thus simulating the binding mode of the natural substrate. Further studies with other glycosidase enzymes and other non-hydrolyzable analogues are in course in order to discriminate whether there is a general pattern of enzyme substrate recognition among the members of a glycosidase family or if that interaction depends mostly on the particular substrate structure or on the enzyme structure details and mechanistic particularities.

Acknowledgements: Financial support by CICYT (grant PB96-0833, Madrid and BIO 97-0511-CO2-01, 1997–2000, Barcelona) and Mizutani Foundation for Glycoscience (grant 1996-85 to J.J.-B.) is gratefully acknowledged. M.V. thanks CERBA for a fellowship and E.M. thanks Farmhispania SA for financial support.

References

- [1] Vyas, N.K. (1991) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1, 732–740.
- [2] Peters, T. and Pinto, B.M. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 710–720.
- [3] McCarter, J.D. and Withers, S.G. (1994) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 885–892.
- [4] Davies, G. and Henrissat, B.H. (1995) *Structure* 3, 853–859.
- [5] Asensio, J.L., Cañada, F.J., Bruix, M., Rodríguez-Romero, A. and Jimenez-Barbero, J. (1995) *Eur. J. Biochem.* 230, 621–633.
- [6] Ni, F. (1994) *Prog. NMR Spectrosc.* 26, 517–606.
- [7] James, T.L. and Oppenheimer, N.J. (1994) *Methods Enzymol.* 239, 1–813.
- [8] Asensio, J.L., Cañada, F.J. and Jimenez-Barbero, J. (1995) *Eur. J. Biochem.* 233, 618–630.
- [9] Espinosa, J.-F., Cañada, F.J., Asensio, J.L., Martín-Pastor, M., Dietrich, H., Martín-Lomas, M., Schmidt, R.R. and Jimenez-Barbero, J. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 10862–10871.
- [10] Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993) *Biochem. J.* 291, 781–788.
- [11] Durand, P., Lehn, P., Callebaut, I., Fabrega, S., Henrissat, B. and Mornon, J.P. (1997) *Glycobiology* 7, 277–284.
- [12] Tews, I., Perrakis, A., Oppenheim, A., Dauter, Z., Wilson, K.S. and Vorgias, C.E. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3, 638–648.
- [13] Alzari, P.M., Souchon, H. and Dominguez, R. (1996) *Structure* 4, 265–275.
- [14] Sulzenbacher, G., Driguez, H., Henrissat, B., Schülein, M. and Davies, G.J. (1996) *Biochemistry* 35, 15280–15287.
- [15] Espinosa, J.F., Montero, E., Vian, A., García, J.L., Dietrich, H., Schmidt, R.R., Martín-Lomas, M., Imberty, A., Cañada, F.J. and Jiménez-Barbero, J. (1997) *J. Am. Chem. Soc.*, in press.
- [16] Perez-Pons, J.A., Cayetano, A., Rebordosa, X., Lloberas, J., Guasch, A. and Querol, E. (1994) *Eur. J. Biochem.* 219, 557–565.
- [17] Driguez, H. (1997) *Top. Curr. Chem.* 187, 85–116.
- [18] Bock, K., Duus, J.O. and Refn, S. (1994) *Carbohydr. Res.* 253, 51–67.
- [19] Geyer, A., Hummel, G., Eisele, T., Reinhardt, S. and Schmidt, R.R. (1996) *Chem. Eur. J.* 2, 981–988.
- [20] Nilsson, U., Johansson, R. and Magnusson, G. (1996) *Chem. Eur. J.* 2, 295–302.
- [21] Dowd, M.K., French, A.D. and Reilly, P.J. (1992) *Carbohydr. Res.* 233, 15–34.
- [22] Kroon-Batenburg, L.M.J., Kroon, J. and Leeftang, B.R. (1993) *Carbohydr. Res.* 245, 21–42.

- [23] Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 277, 680–685.
- [24] Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- [25] Mohamadi, F., Richards, N.G.J., Guida, W.C., Liskamp, R., Caufield, C., Chang, G., Hendrickson, T. and Still, W.C. (1990) *J. Comput. Chem.* 11, 440–467.
- [26] Martín-Pastor, M., Espinosa, J.F., Asensio, J.L. and Jiménez-Barbero, J. (1997) *Carbohydr. Res.* 298, 15–49.
- [27] Thøgersen, H., Lemieux, R.U., Bock, K. and Meyer, B. (1982) *Can. J. Chem.* 60, 44–57.
- [28] Dabrowski, J., Kozár, T., Grosskurth, H. and Nifant'ev, N.E. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5534–5539.
- [29] Burmeister, W.P., Cottaz, S., Driguez, H., Iori, R., Palmieri, S. and Henrissat, B. (1997) *Structure* 5, 663–675.
- [30] Imoto, T., Johnson, L.N., North, A.C.T., Phillips, D.C. and Rupley, J.A. (1972) in: *The Enzymes* (Boyer, P.D., Ed.) vol. 7, pp. 665–868, Academic Press, New York.
- [31] Sinnott, M.L. (1990) *Chem. Rev.* 90, 1171–1202.
- [32] Heightman, T.D., Locatelli, M. and Vasella, A. (1996) *Helv. Chim. Acta* 79, 2190–2200.
- [33] Wiesmann, C., Hengstenberg, W. and Schulz, G.E. (1997) *J. Mol. Biol.* 269, 851–860.

AGRAÏMENTS

Aprofitaré la llibertat d'estil d'aquest apartat per expressar, saltant-me de la norma, els meus agraïments per la realització d'aquest treball. Suposo que és la part més llegida de la tesi perquè tothom hi busca els noms i els adjectius corresponents de cada company de feina, incloent-se ell mateix, proposats per l'autor. Aquesta part, oh desilusió, la salto ràpidament amb:

Agraeixo a tots els que m'han envoltat en aquesta tesi, i especialment als que ja ho saben; i aprofito per demanar disculpes si he fet quelcom indegut; a banda d'haver trigat massa temps, fet del qual també jo en pago les conseqüències.

Però la realització d'aquest treball ha estat gràcies a moltes persones a les que vull fer protagonista d'aquest apartat.

Un company del laboratori va afegir un acudit de la Mafalda a la seva tesi. La Mafalda acabava afirmant: *el que és urgent no deixa temps per al que és important*. A mi em semblava que la justificació del seu treball no era ni tan sols la urgència sinó un interès econòmic darrera; malauradament això crec que està molt generalitzat.

Per altra banda, m'interpel·la la reflexió que fa Schindler al final de la pel·lícula de Spielberg, quan surt del camp de concentració a punt de ser alliberat i se n'adona que una mica d'esforç a la seva vida hauria pogut salvar encara més víctimes jueves de la barbàrie. A aquesta manera de veure el nostre temps que ens passa factura (al menys en el subconscient) dels nostres fruits, li sumo una visió pessimista del món (citant al Gabriel Celaya, *estamos tocando fondo*); i el resultat és que encara estic més estressat en evitar perdre el temps (al menys en la activitat principal); entenc el perdre el temps com fer activitats que no ajudin a millorar el món.

I, està molt malament el món? tan malament que fa que uns agraïments s'hagin de convertir en una vall de llàgrimes?

El meu pare em recordava fa temps que m'ha tocat viure a la millor època de la història. Però els indicadors de sostenibilitat són desastrosos, i les desigualtats entre rics i pobres cada cop majors. Puc reconèixer que la qualitat de vida ha millorat en general arreu, però la societat occidental continua hipotecant la igualtat futura amb l'inconscient però exagerat consum de recursos. Així, si no cambien les tendències, les generacions que em seguiràn no tindran tanta sort com jo; i de moment cent-mil persones deixen de tenir futur cada dia per culpa de la gana.

Però les tendències s'estan capgirant. La consciència de la necessitat de canvi (un altre món és possible) ho demostren les cada cop més nombroses manifestacions al carrer. I cada cop el llenguatge hipòcrita de desenvolupament sostenible de la indústria i administracions públiques genera més consciència en comptes de calmar les masses.

Jo no penso que el treball que es presenta en aquesta tesi sigui inútil per millorar el món; però no cal saber-ne gaire que s'allunya de les prioritats per fer d'aquest món una llar agradable per tothom; és tan sols un granet de sorra per a la platja del coneixement. En canvi hi ha altres tasques que impliquen una dedicació més directa a la resolució de problemes *importants i*

urgents. Crec que hi ha molta gent que està ficada en aquests temes més prioritaris, i són aquests els que vull com a protagonistes d'aquests agraïments. La meva consciència dorm tranquil·la sabent que s'estan resolvent els problemes que ens afecten de forma global.

També vull agraïr a altres actors secundaris com jo que tenim de *leit motif* la millora de la qualitat de vida dels habitants de la terra. Que cadascú es jutgi els seus propis objectius.