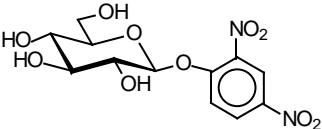
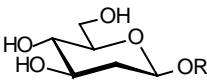
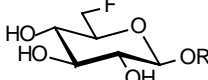
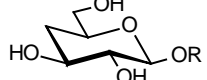
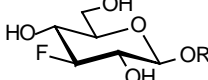
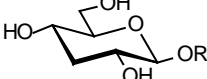
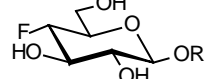
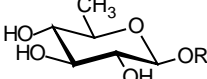
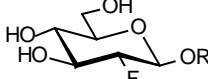


Capítol 4. Importància de l'hidroxil a C2 en el mecanisme enzimàtic de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*

4.1. Influència dels substituents en la hidròlisi espontània de glicòsids

La hidròlisi espontània de glicòsids és una reacció molt lenta, que porta associats temps de vida mitja de l'ordre de 10^6 - 10^7 anys per als biopolímers basats en la seva estructura [2]. Per tal d'avaluar la influència dels seus substituents en la velocitat d'hidròlisi, es compara la mateixa per a una sèrie de compostos d'aquesta família respecte de la d'una família de compostos anàlegs. Els anàlegs més emprats són els desoxi- i fluorodesoxi- en les diferents posicions del sucre, en què se substitueixen els diferents hidroxils del glicòsid per un àtom d'hidrogen o de fluor. Fent servir aquesta estratègia es comprova que generalment la velocitat d'hidròlisi d'un glicòsid augmenta com a conseqüència de la deshidroxilació [309, 323-326].

Taula 4.1. Velocitats d'hidròlisi espontània d'una família de 2,4DNP glicòsids en què s'ha substituït sistemàticament un dels hidroxils de les diferents posicions de l'anell de piranosa per un àtom d'hidrogen (desoxiglicòsids) o per un de fluor (desoxifluoroglicòsids) [326].

			$k_H = 5.58 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$
	$k_H = 8.54 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1} *$		$k_H = 1.99 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$
	$k_H = 1.25 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$		$k_H = 8.23 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$
	$k_H = 2.23 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$		$k_H = 3.74 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$
	$k_H = 2.60 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$		$k_H = 1.45 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$

*: El 2,4DNP 2-desoxi-β-D-glucòsid és massa làbil per a la seva purificació i caracterització, de manera que el valor de la velocitat d'hidròlisi s'estima basant-se en una correlació (pendent 1.1; $r = 0.997$) entre les velocitats d'hidròlisi dels 2,4DNP β-D-glucòsids amb els d'una sèrie anàloga de fosfats d'α-D-glucosil [325].

La velocitat d'hidròlisi espontània relativa d'una sèrie de desoxi- i fluorodesoxiglicòsids respecte del sucre natural segueix el següent patró 2-desoxi > 4-desoxi > 3-desoxi ≈ 6-desoxi > sucre natural > 6-desoxi-6-fluoro > 3-desoxi-3-fluoro > 4-desoxi-4-fluoro > 2-desoxi-2-fluoro glicòsids, com s'exemplifica en el cas concret del 2',4'-dinitrofenil β-D-glucòsid a la taula 4.1. Aquestes velocitats s'expliquen en base a les estabilitats relatives de l'estat de transició oxocarbocatiònic en els diferents glicòsids, que està influenciat

principalment per l'efecte electrònic exercit pels substituents de l'anell sobre la càrrega que es desenvolupa, majoritàriament, sobre l'oxigen endocíclic [326, 327]. D'aquesta forma, com més electronegatiu sigui el substituent de l'anell, més es desestabilitza l'estat de transició, fent que la reacció sigui més lenta. Ara bé, les diferències de velocitats dins de les diferents sèries de glicòsids, desoxi i desoxifluoro, no depenen únicament d'efectes de camp i segurament també reflecteixen diferències en factors estèrics o en una diferent solvatació, ja que, d'altra manera, l'ordre de les velocitats de reacció seguiria la proximitat del substituent al centre de desenvolupament de càrrega [326].

4.2. Influència dels substituents en la hidròlisi de glicòsids catalitzada per glicosidases

En el cas de la hidròlisi enzimàtica de glicòsids, a més de l'efecte electrònic, la unió enzim-substrat juga un paper molt important en la velocitat de reacció relativa dels diferents sucres. Pel que fa a l'efecte electrònic, l'origen és el mateix, però el seu grau d'importància és variable, ja que la densitat de càrrega desenvolupada a l'estat de transició és un tret característic de cada glicosidasa. D'altra banda, també són transcendents els efectes estèrics, fruit de les interaccions no-covalents que es desenvolupen entre l'enzim i el substrat en l'estat de transició, i en el cas concret de les glicosidases, aquelles que impliquen els diferents grups hidroxil són bàsicament interaccions per ponts d'hidrogen. Aquestes interaccions són estabilitzadores, de manera que des del punt de vista dels efectes estèrics, la presència d'hidroxils en els glicòsids és beneficiosa de cara a l'augment de la velocitat d'hidròlisi. Així doncs, es tracta de dos efectes, l'electrònic i l'estèric, que actuen en sentits contraposats, i que estableixen una gran diversitat en la importància dels diferents grups hidroxils dels glicòsids. En el cas de fer servir anàlegs de glicòsids per a l'estudi d'aquests efectes, queda clar que en els desoxianàlegs l'efecte estabilitzant dels ponts d'hidrogen es perd per complet, i en el cas dels fluorodesoxianàlegs només es perd completament si el grup hidroxil substituït és cessor de pont d'hidrogen. El fet de no poder determinar les contribucions individuals dels dos efectes (electrònic i estèric) impedeix el discerniment de la seva importància relativa; tot i així, en moltes glicosidases la interacció amb l'enzim d'un grup hidroxil en concret ha sobrepassat en gran mesura l'efecte acceptor de la seva naturalesa electrònica [30].

4.3. Paper del residu que actua com a nucleòfil en l'estabilització de l'estat de transició

Malgrat que durant el cicle catalític el substrat travessa tota una sèrie de canvis conformacionals, l'enzim no pateix canvis estructurals significatius, i s'adapta als canvis conformacionals del substrat variant les interaccions que aquest estableix amb els diferents residus del centre actiu. Així, a través d'una sèrie de grups situats amb precisió per part de l'enzim s'estableixen una sèrie d'interaccions que dispersen la càrrega de l'estat de transició, tant per formació de xarxes de ponts d'hidrogen, com per interaccions electrostàtiques. Entre aquests residus, pren un paper clau el residu que actua com a nucleòfil. S'ha comprovat que a les glicosidases que actuen amb retenció de configuració la posició d'aquest residu està molt ben fixada [97, 143, 328, 329], i petites alteracions de la mateixa provoquen disminucions importants en l'activitat

enzimàtica. Sembla que l'oxigen carbonílic del residu que actua com a nucleòfil juga un paper especialment important en l'estabilització de l'estat de transició, interaccionant amb l'hidroxil a C2 en les β -glicosidases que actuen amb retenció de configuració [97, 98, 330] o estabilitzant directament la densitat de càrrega desenvolupada sobre l'oxigen endocíclic en les α -glicosidases [103, 119, 121]. El fet que el nucleòfil jugui un paper igualment clau, però diferent, en funció de la configuració anomèrica del substrat, és consistent amb el fet que, en cada cas, l'enzim hagi evolucionat per tal de fer front de la millor manera possible a tots els canvis que es donen entre l'estat fonamental i l'estat de transició, per tal d'acabar catalitzant la reacció d'una manera optimitzada [331]. A partir d'aquest moment en aquest capítol, sempre que es parli de β -glicosidases es fa referència a β -glicosidases que actuen amb retenció de configuració, a no ser que s'indiqui el contrari.

Són diverses les estructures cristal·logràfiques de complexos d'intermedis covalents de diferents glicosidases en què s'observa que l'oxigen carbonílic del nucleòfil està implicat en un pont d'hidrogen curt amb l'hidroxil (o a una distància molt reduïda del fluorur en el cas dels 2-desoxi-2-fluoro anàlegs) a C2. El fet que s'hagi descrit que a l'estat de transició aquesta interacció sigui molt forta en el cas de les β -glicosidases, i que la distància entre el nucleòfil i aquest hidroxil sigui tan curta, de 2.37 Å en el cas de la Cex de *Cellulomonas fimi* [98], i d'aproximadament 2.5 Å en altres casos [97, 99, 115], fan pensar que sigui el principal responsable de l'estabilització de l'estat de transició a la catàlisi enzimàtica. Per exemple, a l'estructura de l'intermedi 2-desoxi-2-fluorocel·lobiosil-enzim amb l'exoxilanas/cel·lulasa Cex de *Cellulomonas fimi* [98], els residus que estan més a prop del fluorur situat a C2 són l'Asn126, que és un residu conservat dins de la família, i l'oxigen carbonílic del nucleòfil (figura 4.1).

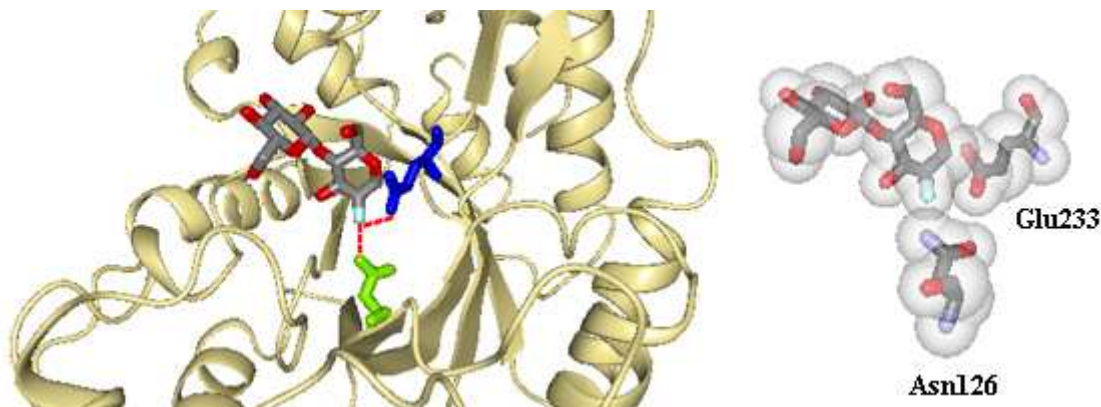


Figura 4.1. Estructura parcial del complex covalent 2-desoxi-2-fluorocel·lobiosil-enzim en l'exoxilanas/cel·lulasa Cex de *Cellulomonas fimi* [98]. Es mostra el glicòsid i els residus que estan a distància de pont d'hidrogen amb l'hidroxil (en aquest cas fluorur) a C2, en verd l'Asn126 i en blau el Glu233 (nucleòfil).

A través d'estudis de mutagènesi es comprova que dels més de 10 kcal·mol⁻¹ que s'assignen en aquest enzim a l'estabilització de l'estat de transició deguda a la interacció a C2 amb el seu substrat natural, la interacció amb l'amida de l'Asn126 contribueix aproximadament només 2.5 kcal·mol⁻¹ [332, 333]. Per tant la interacció amb el nucleòfil carregat sembla que és la major força de la interacció amb aquest hidroxil. Aquesta no es pot determinar directament per mutació del mateix, ja que la mutació d'aquest residu, en ser un dels dos residus essencials implicats en catàlisi, rendeix un enzim inactiu.

Se suggereix que la interacció entre l'hidroxil a C2 i el nucleòfil que s'observa en els intermedis, s'optimitza a l'estat de transició tant geomètricament, ja que l'anell s'aplanar i posiciona l'hidroxil a C2 més a prop del nucleòfil, com electrònicament, ja que la càrrega positiva que es desenvolupa al voltant del centre anomèric, acidifica transitòriament l'hidroxil a C2, augmentant la seva capacitat de donador de pont d'hidrogen.

En el cas dels β -mannòsids, que tenen l'hidroxil a C2 en configuració estereoquímica oposada als glucòsids, se suggereix que la conformació adoptada per l'estat de transició és la de $B_{2,5}$ [74], que en posicionar l'hidroxil a C2 pseudoequatorial és l'única que permetria aquesta aproximació amb el nucleòfil (figura 4.2). Aquesta conclusió, a la que s'arriba en base a l'estructura del complex de Michaelis i del complex de l'intermedi covalent en el cas de la β -mannanasa de *Pseudomonas cellulosa* [74], dóna idea de la importància d'aquesta interacció en les β -glicosidases, ja que inclús amb glicòsids en què l'hidroxil a C2 en el sucre lliure porta a pensar que quedarà lluny del nucleòfil, el glicòsid és capaç de realitzar un canvi conformacional adient a l'estat de transició, per tal de disminuir la distància entre aquests dos residus i permetre que es pugui donar el pont d'hidrogen. Des del punt de vista energètic s'ha observat que les energies associades a aquesta interacció en el cas dels mannooligosacàrids també és especialment important. Per exemple, en el cas de la β -mannosidasa de *Cellulomonas fimi* [334] fent servir un 2-desoxianàleg del substrat s'observa que la interacció amb l'hidroxil a C2 comporta una $\Delta\Delta G^\ddagger = 5.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Tenint en compte que aquest valor només és una estimació mínima, ja que les propietats d'acceptor de càrrega dels grups hidroxil fan que els substrats completament hidroxilats siguin inherentment menys reactius que els seus anàlegs 2-desoxi, l'energia atribuïda a aquesta interacció és de l'ordre de magnitud d'altres interaccions importants obtingudes en el cas d'altres β -glicosidases que actuen amb retenció de configuració.

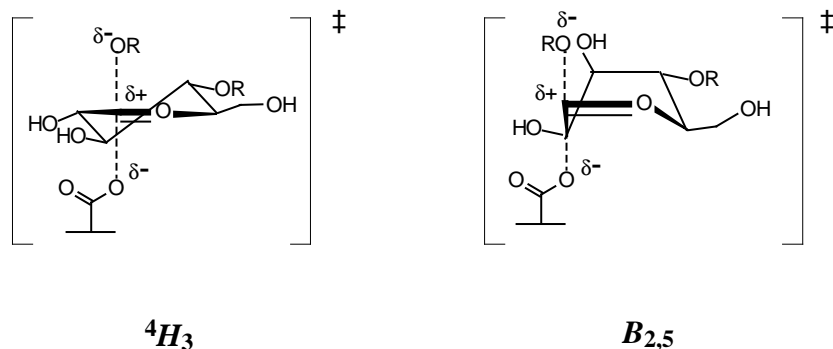


Figura 4.2. Conformacions 4H_3 i $B_{2,5}$ adoptades a l'estat de transició per un β -glucòsid i un β -mannòsid, respectivament.

Tot i reconeixent el paper del nucleòfil en l'estabilització de l'estat de transició, per formació d'un pont d'hidrogen amb l'hidroxil a C2, no s'han de menystenir les interaccions que aquest mateix hidroxil pugui exercir amb altres grups del centre actiu. El fet que alguns dels residus amb els que forma ponts d'hidrogen siguin residus conservats dins de les diferents famílies de glicosidases dóna idea de la importància d'aquestes interaccions [335]. Per exemple, a la β -galactosidasa d'*Escherichia coli* l'asparagina 460 és un residu conservat que està situat a prop del residu àcid/base general, i s'ha observat que forma un pont d'hidrogen amb el substituent a C2 en

l'intermedi covalent i en complexos amb anàlegs a l'estat de transició [51]. Amb freqüència, aquesta interacció addicional amb l'hidroxil a C2 està mediada per una asparagina, com es veu a les estructures cristal·logràfiques de complexos amb diverses glicosidases [66, 69, 98, 102, 125, 336-339]. De fet, en els enzims del clan GH-A que hidrolitzen substrats amb configuració *manno*- i *gluco*-, que sembla que comparteixen els mateixos elements de reconeixement, generalment hi ha una asparagina, un aspartat o una histidina a prop de la posició de l'hidroxil a C2, que s'ha postulat que pot jugar un paper important assistint a la formació de l'intermedi glicosil-enzim [52]. En el cas concret de les β -mannosidases de la família 1, sembla que aquest residu, que és un aspartat, està implicat a més en la definició de l'especificitat de l'enzim per mannòsids [340].

4.4. Interaccions amb l'hidroxil a C2 en el cas de β -glicosidases

S'han realitzat nombrosos experiments per tal d'avaluar la importància que tenen les interaccions per ponts d'hidrogen amb el substrat, en la hidròlisi catalitzada per diverses β -glicosidases (les β -glucosidases d'ametlla [341], d'*Aspergillus wentii* [309], d'*Aspergillus oryzae* [323], d'*Agrobacterium faecalis* [30], i amb les β -galactosidases d'*Escherichia coli* [31, 342], i intestí prim de xai [343]). Es comprova que cada glicosidasa marca les seves preferències, tanmateix, sembla que la contribució de l'hidroxil adjacent al carboni anomèric, és a dir l'hidroxil a C2 de la unitat de piranosa que ocupa el subseti -1, és especialment important [309, 323]. Aquest hidroxil sol contribuir entre 5 i 10 kcal·mol⁻¹ a la catàlisi en aquests enzims, mentre que els altres hidroxils de l'anell contribueixen entre 1 i 2 kcal·mol⁻¹ [30, 31, 98, 330, 344].

S'ha proposat [97, 98] que les elevades energies associades a la interacció amb l'hidroxil a C2, amb distàncies entre oxígens de 2.5 Å o inferiors en el complex de l'intermedi covalent, s'apropen a les dels enllaços per pont d'hidrogen fort, o de tipus *low barrier* (LBHB), observats en altres sistemes [345, 346]. Els resultats obtinguts mostren que les variacions en els valors dels paràmetres cinètics de substrats hidroxilats enfront dels desoxianàlegs és més gran en el cas de k_{cat}/K_M (que dona informació sobre l'estat de transició) que no en K_M (que correspon al complex de Michaelis) [347, 348]. Aquests resultats són coherents amb la presència d'un pont d'hidrogen que s'enforteix a l'estat de transició, on la distorsió de l'anell escurça més la distància entre el nucleòfil i l'hidroxil a C2, i on l'augment transitori de la seva acidesa fa que el seu pK_a s'apropi més al pK_a del nucleòfil. La principal crítica a aquesta proposta és que és innecessari atribuir a una única interacció tota la diferència energètica que comporta el pas a l'estat de transició, quan al centre actiu d'un enzim hi ha nombrosos residus que poden interaccionar alhora amb el substrat. Tot i així, la tesi de la importància de l'hidroxil a C2 es veu reforçada per la potència dels inhibidors anàlegs a l'estat de transició que fan servir aquesta interacció [51, 57, 101, 333, 349-351].

Sembla que la gran contribució d'aquest hidroxil a l'energia d'unió de l'estat de transició pot anar lligada a un paper decisiu de la distorsió d'aquesta unitat sacarídica en l'itinerari de reacció. L'hidroxil a C2 és el que pateix els majors canvis d'orientació i posicionament observats durant la distorsió de l'anell de piranosa [31, 51], i, contant que la distorsió d'una unitat de glucopiranosa des d'una conformació de cadira relaxada ⁴C₁ a una conformació tensionada, com la que adopta a l'estat de transició, comporta un cost energètic d'aproximadament 10 kcal·mol⁻¹ [352, 353], les variacions d'energia

lliure lligades a les interaccions amb aquest hidroxil poden ser quantitativament determinants en la distorsió de l'anell [344, 354]. D'altra banda, les interaccions que es donen a la resta de posicions de l'anell sacarídic permeten mantenir l'anell de piranosa a lloc.

4.5. Interaccions amb l'hidroxil a C2 en les α -glicosidases

En el cas de les α -glicosidases sembla que la situació és una mica diferent ja que l'hidroxil a C2 no sempre juga un paper tan crític en la hidròlisi del substrat i hi ha una contribució més equitativa dels diferents grups hidroxil de la molècula de substrat en l'estabilització de l'estat de transició, tot i que la importància relativa dels diferents grups depèn molt de cada enzim. Hi ha casos, com en els enzims de la família 13 (les α -glicosidases de mel d'abella, de *Streptomyces cerevisiae*, de *Bacillus stearothermophilus*, de llevat i l'oligo-1,6-glicosidasa de *Bacillus cereus*), en què els grups hidroxil del substrat interaccionen amb l'enzim per formació de ponts d'hidrogen amb residus carregats, molts dels quals són motius conservats a la seqüència d'aquests enzims [317]. A la taula 4.2 es presenta un resum dels resultats obtinguts en el cas de diferents α -glicosidases. Tret de la glucoamilasa d'*Aspergillus niger*, la resta d'enzims de la taula actuen a través d'un mecanisme amb retenció de configuració.

Taula 4.2. Resum dels resultats obtinguts en la hidròlisi de desoxianàlegs en el cas d' α -glicosidases. Per a cada enzim s'indica la transcendència de la interacció amb l'hidroxil a C2, juntament amb altres consideracions d'aquest tipus d'estudi. Al costat del nom de l'enzim s'indica el tipus de mecanisme de reacció (I: inversió de configuració, R: retenció de configuració).

Enzim	Interacció a C2	Comentaris
glucoamilasa d' <i>Aspergillus niger</i> [355-359], (I)	No important	Els hidroxils a C4 i C6 de l'extrem no-reductor són crítics per a la hidròlisi del substrat.
α -glicosidasa d'arròs [315], (R)	No important	Hidrolitza el 2-desoxianàleg a una velocitat superior que el substrat natural.
α -glicosidasa de remolatxa [316], (R)	No important	Hidrolitza el 2-desoxianàleg a una velocitat superior que el substrat natural.
α -glicosidasa de blat de moro [316], (R)	No important	Hidrolitza el 2-desoxianàleg a una velocitat superior que el substrat natural.
α -glicosidasa d' <i>Aspergillus niger</i> [316], (R)	No important	Hidrolitza el 2-desoxianàleg a una velocitat superior que el substrat natural.
α -glicosidasa II de fetge de rata [360], (R)	No important	Hidrolitza el 2-desoxianàleg a una velocitat superior que el substrat natural. La resta d'hidroxils de l'extrem no reductor són essencials per al reconeixement del substrat.
α -glicosidasa I de fetge de rata [360], (I)	Important	Tots els hidroxils de l'extrem no-reductor són importants per al reconeixement del substrat, tot i que l'hidroxil a C2 sembla el menys crític.
α -glicosidasa d'ordi [361], (R)	Important	Les interaccions amb la resta d'hidroxils són més importants. La velocitat d'hidròlisi de la 2-desoximaltosa és més de 30 vegades inferior a la de la maltosa.

2 α -glucosidasas de mel d'abella [316], (R)	Important	Tots els hidroxils de l'extrem no-reductor són necessaris per a la hidròlisi.
α -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [316], (R)	Important	Tots els hidroxils de l'extrem no-reductor són necessaris per a la hidròlisi.
α -glucosidasa de <i>Bacillus stearothermophilus</i> [316], (R)	Important	Tots els hidroxils de l'extrem no-reductor són necessaris per a la hidròlisi.
α -glucosidasa de llevat [317, 362], (R)	Important	Tots els hidroxils de l'extrem no-reductor són necessaris per a la hidròlisi. Les interaccions més importants són amb l'hidroxil a C2, es proposa per a aquest hidroxil un paper similar al que juga a les β -glicosidasas.
oligo-1,6-glicosidasa de <i>Bacillus cereus</i> [317], (R)	Important	Tots els hidroxils de l'extrem no-reductor són necessaris per a la hidròlisi. Les interaccions més importants són amb l'hidroxil a C2.
α -galactosidasa de gra de cafè [363], (R)	No important	Els hidroxils a C3 i C4 de l'extrem no-reductor són essencials. Hidrolitzen els anàlegs 2- i 6-desoxi més lentament que el galactòsid original.
α -galactosidasa de <i>Mortierella vinacea</i> [363], (R)	No important	Els hidroxils a C3 i C4 de l'extrem no-reductor són essencials. Hidrolitzen els anàlegs 2- i 6-desoxi més lentament que el galactòsid original.
α -galactosidasa d' <i>Aspergillus niger</i> [363], (R)	No important	Tots els hidroxils de l'extrem no-reductor tret de l'hidroxil a C2 són importants. Hidrolitza el 2-desoxianàleg a una velocitat molt superior que el substrat natural.
α -mannosidasa de <i>jack bean</i> [364], (R)	Important	Els hidroxils a C2, C3 i C4 de l'extrem no-reductor són essencials per a la hidròlisi.
α -mannosidasa d'ametlla [364], (R)	Important	Els hidroxils a C2, C3 i C4 de l'extrem no-reductor són essencials per a la hidròlisi.

Com a conclusió de tots aquests experiments es pot deduir que la importància de l'hidroxil a C2 és molt variable en el cas de les α -glicosidasas, i que tot i que per a alguns enzims es proposa una importància comparable a la que se li atorga en el cas de les β -glicosidasas, per a d'altres sembla tenir un paper més aviat desestabilitzant a l'estat de transició.

4.6. Estudi del paper de l'hidroxil a C2 per a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

La 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* és una glicosidasa que actua amb retenció de configuració i donada la transcendència de la interacció amb l'hidroxil a C2 per a aquest tipus de glicosidasas, s'ha decidit realitzar l'estudi corresponent en aquest enzim.

Aquest estudi s'aborda des de dos punts de vista complementaris, d'una banda es muten els residus de la proteïna que se suposa que interaccionen amb l'hidroxil en concret, i de l'altra, se sintetitza un substrat en què el grup hidroxil a C2 s'ha substituït per un àtom d'hidrogen. L'estudi cinètic posterior de les espècies resultants ha de permetre avaluar la importància de la interacció a C2. Per tal de saber quins són els residus que

interaccionen amb l'hidroxil en qüestió es va recórrer inicialment a un modelatge molecular de l'estructura de l'hexasacàrid G4G4G3G4G4G al centre actiu de la 1,3-1,4- β -glucanasa anàloga de *Bacillus macerans* (figura 4.3) [187].

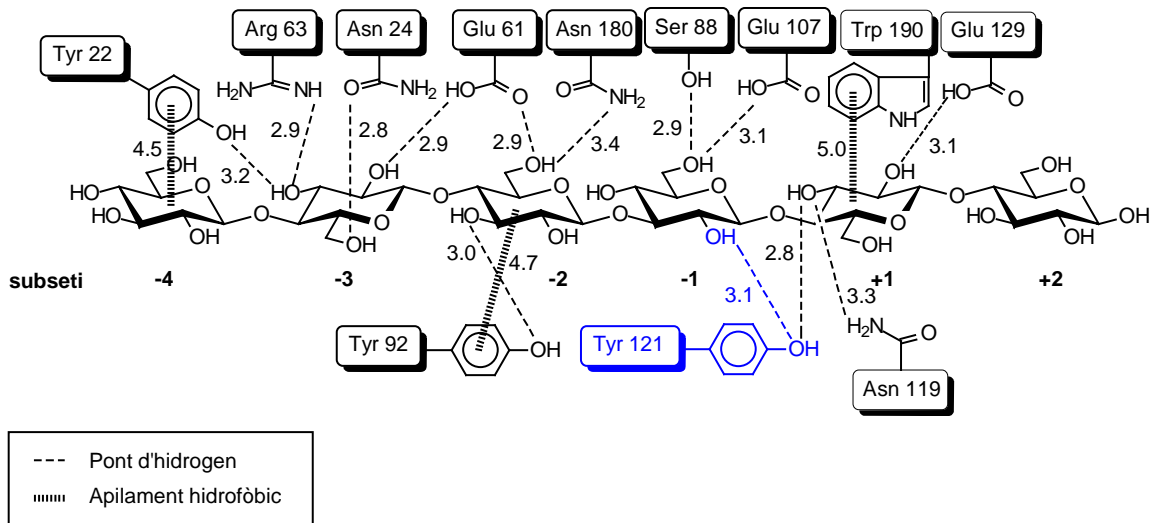


Figura 4.3. Mapa d'interaccions proposat per modelatge molecular del complex β -glucanasa-hexasacàrid per a l'enzim de *Bacillus macerans* [187]. En blau s'indica la Tyr121 (Tyr152 en la nomenclatura de *Bacillus licheniformis*) que es proposa que interacciona amb l'hidroxil a C2 formant un pont d'hidrogen de 3.1 Å.

En aquest modelatge, en què el substrat cobreix per complet el centre actiu de l'enzim, es proposa que l'hidroxil a C2 del subunitat -1 només interacciona per pont d'hidrogen amb el residu que es correspon amb la tirosina 152 de la β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, i que el residu que actua com a nucleòfil està massa allunyat per establir interaccions amb ell. Ara bé, el posicionament del substrat al centre actiu en aquest modelatge no és del tot correcte ja que no contempla la distorsió de la unitat de glucopiranososa que ocupa el subunitat -1, i aquest canvi de conformació possiblement fa variar les interaccions enzim-substrat, especialment al voltant de l'hidroxil a C2. De manera que l'estudi s'aborda tenint en compte la tirosina 152 i el glutamat 134 (nucleòfil), donada la transcendència que s'atribueix a la interacció amb el nucleòfil en nombroses β -glicosidases. Com la mutació del residu que actua com a nucleòfil rendeix un enzim inactiu, aquesta interacció no es pot estudiar directament, sinó a través de la mutació d'altres residus que interaccionen amb ell. Tant a les diferents estructures cristal·logràfiques de les 1,3-1,4- β -glucanases de *Bacillus*, com als modelatges amb diferents lligands, s'observa que la tirosina 152 estaria formant una interacció d'apilament hidrofòbic amb el triptòfan 132, que alhora interacciona per pont d'hidrogen amb el nucleòfil, possiblement contribuint al seu correcte posicionament (figura 4.4). Estudis de mutagènesi sobre el triptòfan de la β -glucanasa de *Bacillus macerans* que es correspon amb el Trp132 a la β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* demostren que aquesta interacció és important en el posicionament del nucleòfil, ja que rendeixen un mutant inactiu [212]. A la vista dels resultats obtinguts amb la β -glucanasa de *Bacillus macerans*, la mutació del Trp132 tampoc permet avaluar la interacció amb l'hidroxil a C2, de manera que s'ha de recórrer a mutar la tirosina 152. Així doncs, es planteja l'estudi de la interacció a C2 amb la tirosina 152 fent servir el mutant Y152F,

en què s'elimina el grup hidroxil de la tirosina, i l'estudi de la interacció amb el nucleòfil en base als resultats obtinguts amb el mutant Y152A, en què es muta la tirosina a alanina, afectant d'aquesta manera el correcte posicionament del nucleòfil.

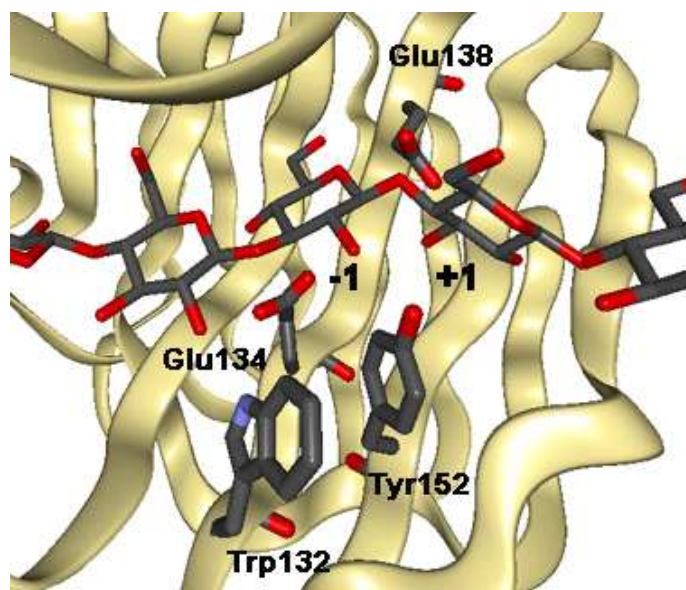


Figura 4.4. Estructura parcial del modelatge del complex de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb l'hexasacàrid G4G4G3G4G4G. A la figura es mostra una secció del centre actiu de l'enzim on se situen la tirosina 152 i el triptòfan 132, apart dels dos residus catalítics.

Per tal de poder realitzar l'estudi de la importància de l'hidroxil a C2 en el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* prèviament s'han d'obtenir dels mutants Y152F i Y152A per tècniques de biologia molecular i s'ha de realitzar l'expressió i purificació de les proteïnes corresponents, així com de l'enzim salvatge. Les etapes d'obtenció dels diferents enzims s'expliquen en el capítol d'expressió i purificació enzimàtica. Pel que fa als lligands emprats, la caracterització cinètica dels enzims s'ha realitzat fent servir el β -glucà d'ordi i el trisacàrid G4G3G-MU (**18**), que s'ha sintetitzat seguint els protocols ja establerts al grup per a la seva obtenció. Els estudis d'inhibició s'han realitzat fent servir com a inhibidor el trisacàrid G4G3G (**1**) obtingut per hidròlisi enzimàtica del β -glucà d'ordi. D'altra banda, l'estudi de l'efecte causat per eliminació de l'hidroxil a C2 s'ha realitzat sobre el substrat G4G4G3G-4NP (**24**), la qual cosa ha obligat a sintetitzar tant aquest tetrasacàrid com el 2-desoxianàleg corresponent (**68**). Com ja s'ha explicat al capítol de síntesi de substrats el compost **24** segueix la mateixa ruta sintètica que el compost **18**, mentre que la síntesi del 2-desoxi glicòsid **68** ha resultat més complexa principalment com a conseqüència de la manca d'aquest hidroxil en concret, i pel paper que desenvolupa el substituent en aquesta posició en l'etapa de glicosidació de la síntesi del substrat. A la figura 4.5 es mostren les estructures dels diferents glicòsids emprats en aquest capítol per a la caracterització cinètica dels enzims.

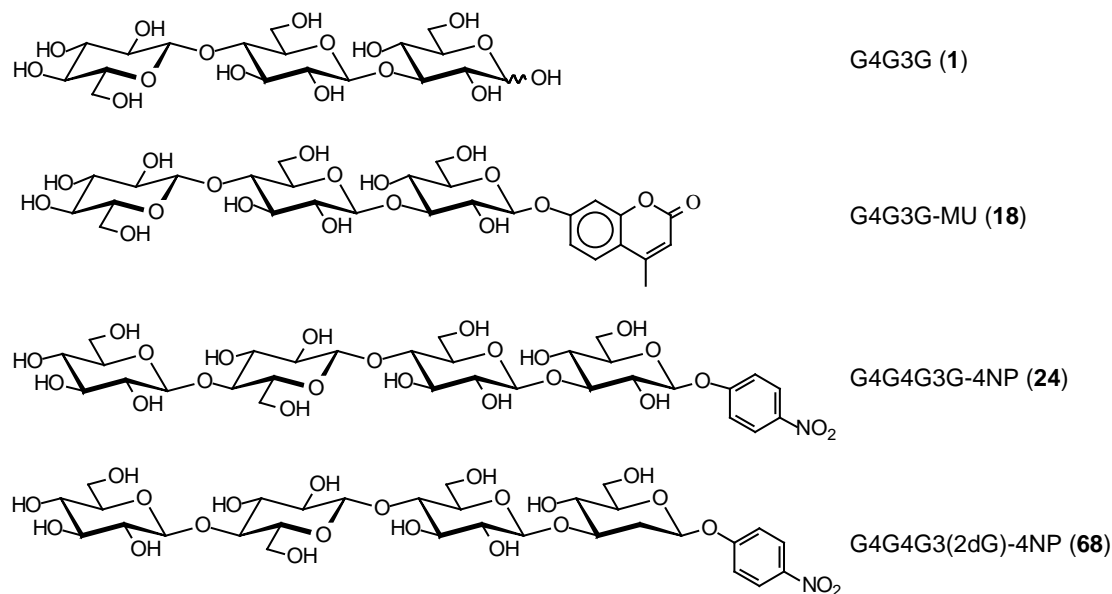


Figura 4.5. Estructura dels tres substrats sintètics (**18**, **24** i **68**) i de l'inhibidor (**1**) emprats en la caracterització de l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

4.6.1. Antecedents

Prèviament a la realització d'aquest treball, al grup ja s'havia realitzat un estudi de mutagènesi avaluant les diferents possibles interaccions enzim-substrat en el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus macerans* [212], que presenta un elevat grau de semblances estructurals i funcionals amb la β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Pel que fa a la posició anàloga a la tirosina 152, d'aquest treball se'n desprèn que:

- La mutació Y121F (anàleg al mutant Y152F de la β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*) no té cap efecte sobre la unió de l'inhibidor G4G3G (**1**), de forma que es va proposar que la tirosina 121 no interacciona directament amb l'hidroxil a C2.
- Si bé la unió de l'inhibidor G4G3G (**1**) per part de l'anàleg al mutant Y152A és millor que la de l'enzim salvatge, l'activitat d'aquest mutant enfront del substrat sintètic G4G3G-MU (**18**) és fins a deu vegades inferior a la de l'enzim salvatge. Es va proposar que la pèrdua d'activitat és deguda a un efecte indirecte de la mutació, que comporta un efecte negatiu sobre el posicionament del nucleòfil.

4.6.2. Perfil d'activitat enfront del pH de l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Es realitza el perfil de pH dels dos mutants de la β -glucanasa en la posició 152 i el de l'enzim salvatge fent servir com a substrat el G4G3G-MU. Es treballa amb tampó 11 mM citrat, 11 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, mantenint la força iònica constant a 0.1 M i a una temperatura de 30 °C. S'ajusta una equació de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat (equació 4.1) als resultats obtinguts. A la figura 4.6 es mostren

les gràfiques de la dependència dels paràmetres cinètics k_{cat} i k_{cat}/K_M amb el pH per als tres enzims.

$$v_0 = \frac{k_{cat} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \quad \text{Equació 4.1.}$$

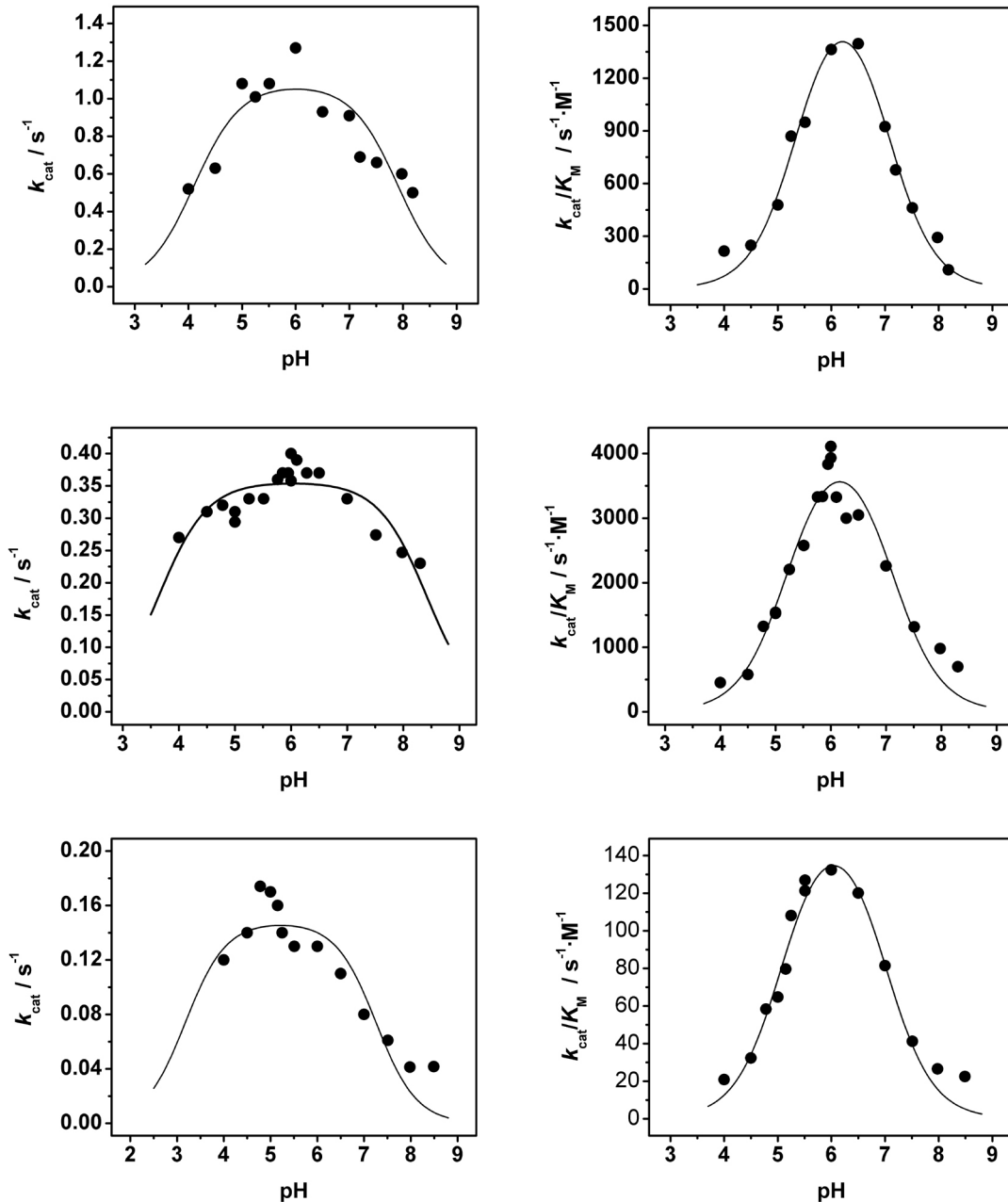


Figura 4.6. Perfils dels paràmetres cinètics k_{cat} (esquerra) i k_{cat}/K_M (dreta) enfront del pH per a l'enzim salvatge (superior), i els mutants Y152F (enmig) i Y152A (a baix) de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Les cinètiques als diferents pH es realitzen en tampó 11 mM citrat, 11 mM fosfat, 0.1 mM $CaCl_2$, força iònica 0.1 M i a 30 °C.

Els ajusts dels perfils de pH sobre el paràmetre k_{cat}/K_M són molt millors que els ajusts sobre el paràmetre k_{cat} . En aquest sentit és important recordar que la informació obtinguda a partir d'aquests paràmetres no només fa referència a espècies enzimàtiques diferents (enzim lliure, en el primer cas, i complex de Michaelis, en el segon), sinó que a més, aporten informació sobre etapes de reacció diferents. En un mecanisme bàsic de retenció de configuració en dues etapes el paràmetre k_{cat}/K_M aporta informació de la reacció fins a la primera etapa irreversible, és a dir fins a l'etapa de glicosidació, mentre que el paràmetre k_{cat} proporciona informació a partir de la primera etapa irreversible, és a dir, l'etapa de glicosidació i tot el que succeeix a continuació, i sigui catalíticament significatiu.

Així doncs, semblaria que per a l'etapa de glicosidació es compleixen les simplificacions assumides en realitzar el perfil de pH (veure apartat 3.6.1), i l'ajust d'una corba gaussiana és bàsicament correcte per al perfil de pH en k_{cat}/K_M . Tanmateix no queda tan clar que aquest sigui el millor ajust per als perfils de pH en k_{cat} . Semblaria que alguna de les assumpcions realitzades per tal d'interpretar els perfils de pH no és del tot correcta. Com no s'observa una pèrdua brusca d'activitat en variar el pH ni en les cinètiques de reacció ni en el perfil de pH (que, a més, s'hauria de veure en els dos perfils de pH), es pot descartar una possible pèrdua d'estabilitat de la β -glucanasa en el marge de pH estudiat. Queden doncs, com a opcions més probables, un canvi d'etapa determinant de la velocitat de reacció en funció del pH, o que hi hagi més d'una espècie enzimàtica activa que es fa evident en estudiar el paràmetre k_{cat} , però no en estudiar el paràmetre k_{cat}/K_M . En no disposar un model cinètic més acurat s'ajusta una gaussiana als perfils de pH tant de k_{cat} com de k_{cat}/K_M amb la finalitat d'obtenir uns bons ajusts dels pK_a cinètics dels enzims lliures, i una aproximació als pK_a cinètics dels complexos de Michaelis. Donat els bons precedents observats en el cas d'altres glicosidases, a l'igual que en el cas del residu que actua d'àcid general en el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* [206], s'ha considerat apropiat assignar els pK_a cinètics obtinguts en els ajusts, als residus que actuen com a nucleòfil i àcid/base general en cada enzim.

Taula 4.3. Valors de pK_a assignats als residus que actuen com nucleòfil (Glu134) i àcid/base general (Glu138) per a l'enzim lliure en el cas de l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

	pK_a Glu134	pK_a Glu138
wt	5.36 ± 0.09	7.06 ± 0.09
Y152F	5.23 ± 0.09	7.1 ± 0.1
Y152A	5.06 ± 0.08	7.0 ± 0.1

Comparant els valors de pK_a dels enzims lliures recollits a la taula 4.3, es comprova que en el cas del Glu138 (residu que actua com a àcid/base general) el pK_a es manté bàsicament constant. Això no és d'estranyar ja que el residu mutat està a una distància de 6.7 Å respecte del Glu138 (Glu138 O ϵ^- - Tyr152 OH), massa lluny per establir cap mena d'interacció directa. A més, aquests resultats indiquen que amb les mutacions tampoc es trenca cap xarxa d'interaccions que impliqui aquest residu. Pel que fa al nucleòfil, sembla que l'eliminació del grup hidroxil en el mutant Y152F no afecta substancialment el seu pK_a , mentre que en el cas del mutant Y152A, la disminució de

0.3 unitats de pK_a ja comença a ser significativa. Aquesta disminució pot anar lligada a la pertorbació de la interacció que es proposa que exerceix la tirosina 152 sobre el nucleòfil a través del triptòfan 132. És possible que en eliminar la interacció d'apilament hidrofòbic la posició del Glu134 variï lleugerament, de manera que es trobi en un entorn més hidrofílic que justifiqui aquesta disminució.

La dependència del paràmetre k_{cat} enfront del pH permet fer una comparació de pK_a similar en el cas del complex enzim-substrat. Com ja s'ha esmentat, aquesta comparació s'ha de realitzar amb força cautela, d'una banda, per la manca de bondat dels ajusts, i de l'altra, perquè com a conseqüència de la mutació es dona un eixamplament (sumat a un desplaçament en el cas del mutant Y152A) dels perfils de k_{cat} enfront del pH (figura 4.7), que fa que la majoria dels resultats obtinguts se situïn a prop del màxim d'activitat. En el cas del mutant Y152F els resultats obtinguts als pH més extrems amb prou feines són un 50% inferiors al màxim d'activitat, mentre que en el cas del mutant Y152A la zona àcida no queda ben definida. Amb tot, els resultats obtinguts en l'ajust es presenten a la taula 4.4.

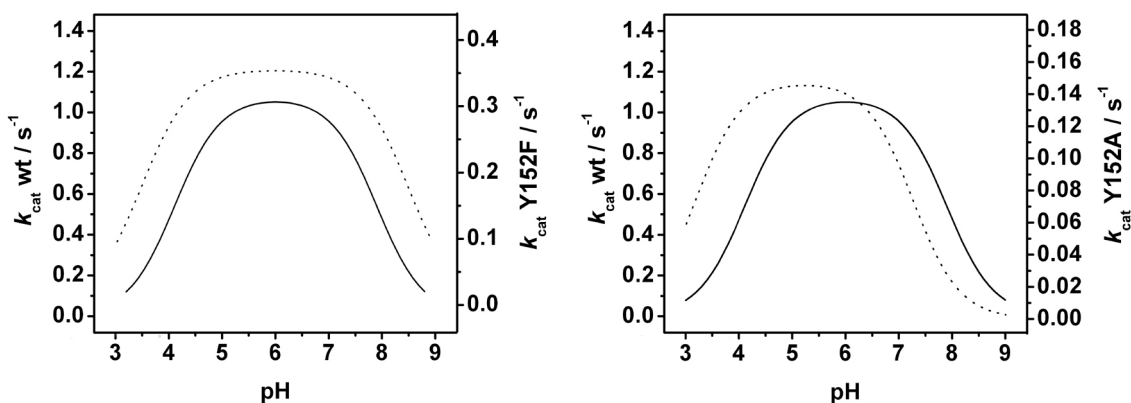


Figura 4.7. Comparació dels perfils de k_{cat} enfront del pH per al mutant Y152F (esquerra) i Y152A (dreta) prenent com a referència l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. En els dos gràfics la línia contínua correspon a l'ajust de l'enzim salvatge i la línia puntejada al dels mutants.

Taula 4.4. Valors de pK_a assignats als residus que actuen com nucleòfil (Glu134) i àcid/base general (Glu138) en el complex enzim-substrat en el cas de l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

	pK_a Glu134	pK_a Glu138
wt	4.1 ± 0.2	7.9 ± 0.2
Y152F	3.7 ± 0.1	8.4 ± 0.2
Y152A	< 4 (3.1)	7.2 ± 0.2

Analitzant la banda de pH bàsics, que és la que està millor definida en el cas dels tres enzims, s'observa que per als tres es dona un augment del pK_a corresponent al residu que actua d'àcid/base general en el complex enzim-substrat respecte del seu valor en

l'enzim lliure. Això és conseqüència directa, d'una banda, de l'expulsió de molècules d'aigua del centre actiu provocada per la unió del substrat, generant d'aquesta manera un entorn de menor constant dielèctrica (més hidrofòbic), que afavoreix l'augment de pK_a ; i de l'altra, del trencament d'una xarxa d'interaccions entre residus del centre actiu, de la que formen part tant el Glu138 com el Glu134, que està present en l'enzim lliure, i que s'ha suggerit que ajuda a modular el seu pK_a .

A la figura 4.8 es presenten tres estructures de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus macerans*, la primera és una estructura d'una part del centre actiu de l'enzim lliure on es veu una xarxa de ponts d'hidrogen en la que estan implicats, entre altres, els dos residus catalítics, el Glu107, que fa el paper d'àcid/base general, i el Glu103, que fa el paper de nucleòfil, (corresponents al Glu138 i el Glu134 en la numeració de *Bacillus licheniformis*) [186]. Les dos figures següents són les de dos complexos enzim-ligand diferents, la del mig correspon al complex amb un tetrasacàrid que s'uneix als subsetis generalment ocupats per l'extrem no-reductor del sucre [149], en què s'han mutat els dos glutamats catalítics a glutamines; i la de la dreta és l'estructura de l'enzim en complex covalent amb un inhibidor, el 3',4'-epoxibutyl cel·lobiòsid, en què la part sacarídica de l'inhibidor s'uneix als subsetis -2 i -1 [183]. En aquestes estructures s'observa que el glutamat 107 està formant un pont d'hidrogen amb la glutamina 117 en l'enzim lliure, que es debilita en el complex amb el producte d'hidròlisi (tetrasacàrid) fins acabar trencant-se en el complex covalent amb l'inhibidor. La glutamina 117 és un dels residus altament conservats a la família 16 de glicosil hidrolases [212]. Un altre residu conservat és l'aspartat 105 (Asp136 a la numeració de *Bacillus licheniformis*), que s'ha suggerit que junt amb els residus que actuen com a àcid/base general i nucleòfil, formen una tríada catalítica, i en més d'una ocasió s'ha atribuït a aquest tercer carboxilat un paper important en el posicionament dels residus catalítics al centre actiu de les glicosidases i en la regulació del seu pK_a [69, 117, 365-369]. Aquest residu que en l'estructura de l'enzim lliure està formant pont d'hidrogen amb el nucleòfil, està formant pont d'hidrogen amb el residu àcid/base general en el modelatge molecular del complex amb l'hexasacàrid [187]. La diferència entre el modelatge molecular i les estructures cristal·logràfiques presentades, és que a les estructures cristal·logràfiques el sucre només ocupa els subsetis de l'extrem no-reductor, mentre que en el modelatge es va treballar amb l'estructura d'un substrat que ocupa completament el centre actiu de l'enzim. Independentment de quina sigui la interacció predominant, que segurament és una combinació de totes, el que és cert és que la unió d'un lligand al centre actiu de l'enzim provoca un acomodament dels seus residus, que pot portar al canvi d'interaccions, i que es pot traduir, entre altres coses, en una variació de pK_a dels residus catalítics.

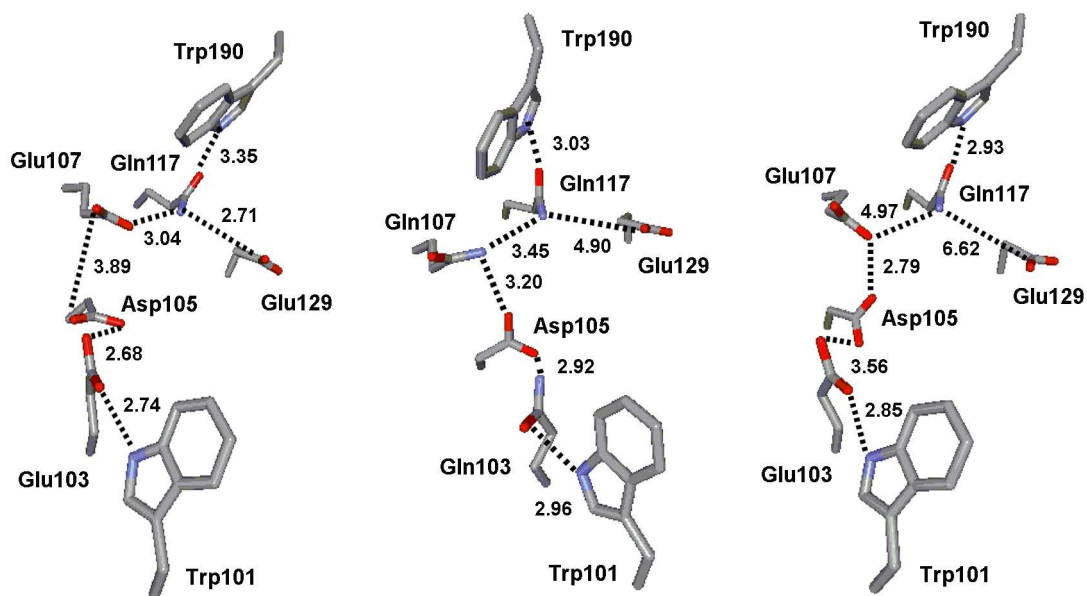


Figura 4.8. Estructures cristal·logràfiques d'una part del centre actiu de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus macerans* en la que s'indica la distància entre els residus que es troben formant una xarxa de ponts d'hidrogen al voltant dels dos residus catalítics. Els residus Glu107 i Glu103 són els residus catalítics d'aquest enzim. D'esquerra a dreta es presenten les estructures obtingudes per a l'enzim lliure, el complex enzim-producte i un complex enzim-inhibidor.

Comparant els valors de pK_a del glutamat 138 per al complex enzim-substrat en els diferents enzims, es comprova com en el cas del mutant Y152F aquest pK_a augmenta, indicatiu d'un entorn més hidrofòbic al voltant d'aquest residu. En estudis de modelatge molecular s'ha observat que l'eliminació del grup hidroxil de la tirosina 152 comporta un apropament entre aquest residu i l'aglicona del substrat, molt possiblement afavorit per una interacció d'apilament hidrofòbic entre ells, i que es fa especialment palès en el cas d'aglicones aromàtiques. Aquesta interacció situa la fenilalanina més a la vora del residu que actua d'àcid/base, augmentant s'aquesta manera el seu pK_a . Com a conseqüència, en el cas del mutant Y152A, en què ja no es pot establir aquesta interacció, el pK_a torna a disminuir, fent-se en aquest cas inferior al de l'enzim salvatge.

Els diferents valors que adopta el pK_a del glutamat 134 en el complex enzim-substrat, entre els diferents enzims, fa de mal comparar, tot i que sembla clar que en els dos mutants aquest valor és inferior al de l'enzim salvatge. Donat que possiblement una de les interaccions més importants que exerceix el nucleòfil en aquest complex és amb l'hidroxil a C2 del substrat, es pot plantejar la interpretació d'aquest resultat en base a aquest pont d'hidrogen. En aquest cas, la disminució del pK_a del nucleòfil en els mutants és conseqüència d'un enfortiment d'aquesta interacció, que sembla més important en el cas del mutant Y152A. Tanmateix, no es poden oblidar la resta d'interaccions que es donen al centre actiu i el paper que juguen en l'establiment dels pK_a dels diferents residus.

La comparació de pK_a entre l'enzim lliure i el complex enzim-substrat del glutamat 134 s'ha d'analitzar amb cura. El que sembla clar és que en els tres enzims es produeix una disminució del seu pK_a en formar el complex de Michaelis. És evident que els mateixos

factors que afecten el pK_a del residu àcid/base general en unir el substrat també influeixen en el pK_a del nucleòfil, però de manera diferent. És possible que en aquest cas la interacció per pont d'hidrogen que s'estableix entre el nucleòfil i l'hidroxil a C2 del substrat prengui un paper destacat. A través d'estudis de mutagènesi dirigida s'ha pogut avaluar que l'energia d'estabilització de l'estat de transició associada a un pont d'hidrogen entre grups no carregats és de 0.5-1.5 kcal·mol⁻¹, i si un dels grups és carregat pot arribar a ser de 3-5 kcal·mol⁻¹ [370-372]. De manera que la disminució de pK_a d'aproximadament 1.3 unitats en el cas de l'enzim salvatge (que és el cas en què es pot valorar millor aquesta diferència), que equival a una energia de 1.8 kcal·mol⁻¹, pot perfectament anar associada a un enfortiment de la interacció per pont d'hidrogen en l'estat de transició. En el cas dels dos mutants possiblement la disminució de pK_a sigui encara més important, cosa que quadraria amb un efecte major de la interacció amb l'hidroxil a C2.

4.6.3. Determinació dels paràmetres cinètics de l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Les cinètiques per tal d'avaluar l'efecte de les mutacions s'han realitzat amb el substrat G4G3G-MU a 30 °C en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, a pH 7.2. Els paràmetres cinètics obtinguts en l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat es resumeixen a la taula 4.5, i a la figura 4.9 es mostren les representacions de les velocitats inicials obtingudes enfront de la concentració de substrat.

Taula 4.5. Paràmetres cinètics obtinguts en l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat a les reaccions de l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU, en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, a pH 7.2 i 30 °C. A la taula es presenta també el valor de la $\Delta\Delta G^\ddagger$ dels mutants respecte de l'enzim salvatge, calculada segons l'equació 4.2.

Enzim	k_{cat} / s^{-1}	K_M / mM	K_I / mM	$(k_{cat}/K_M) / s^{-1}\cdot mM^{-1}$	$\Delta\Delta G^\ddagger / kcal\cdot mol^{-1}$
wt	0.63 ± 0.01	0.92 ± 0.03	11.0 ± 0.7	0.68 ± 0.03	-
Y152F	0.261 ± 0.007	0.18 ± 0.01	4.0 ± 0.3	1.5 ± 0.1	-0.48 ± 0.07
Y152A	0.056 ± 0.001	1.03 ± 0.03	98 ± 2	0.054 ± 0.002	1.52 ± 0.05

$$\Delta\Delta G^\ddagger = -R\cdot T\cdot \ln[(k_{cat}/K_M)_{mutant}/(k_{cat}/K_M)_{wt}] \quad \text{Equació 4.2.}$$

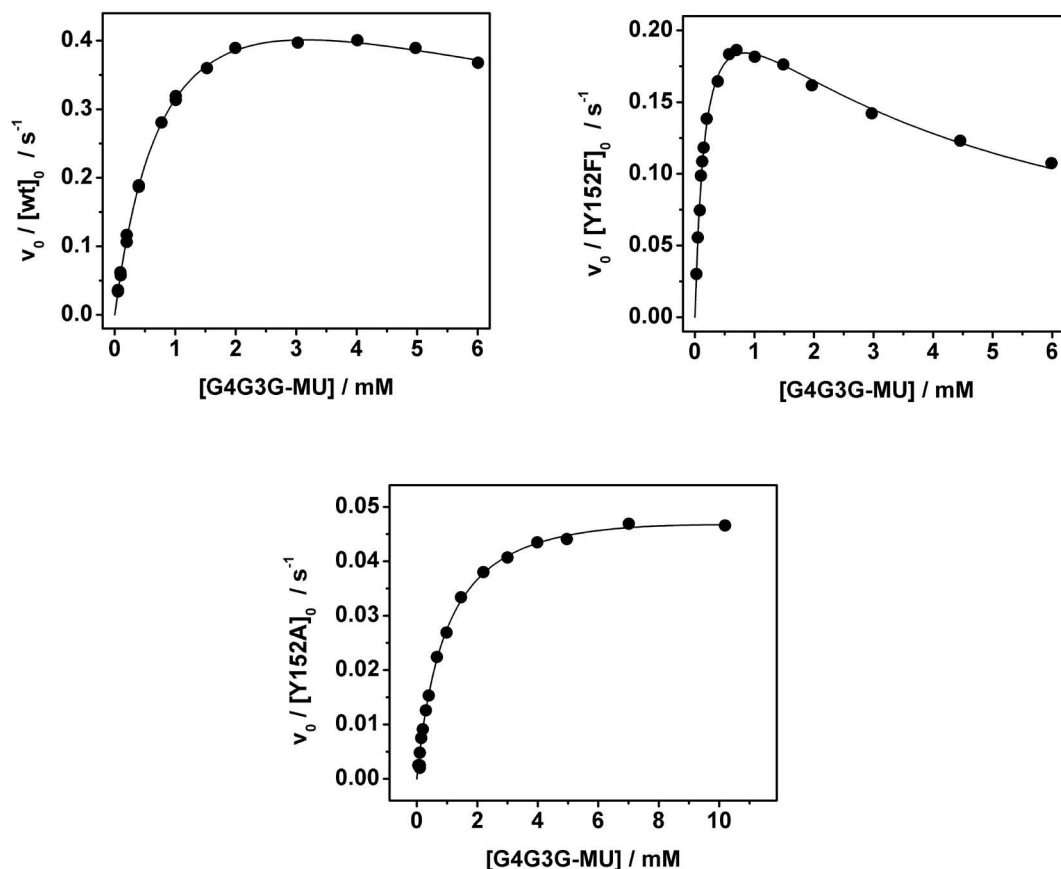


Figura 4.9. Cinètiques d'hidròlisi del substrat G4G3G-MU amb l'enzim salvatge, i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, a 30 °C i pH 7.2. En els tres casos es representa la $v_0/[E]_0$ enfront de la concentració de substrat i s'ajusta un model de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat, segons l'equació 4.1.

La comparació dels resultats obtinguts amb els tres enzims es realitza en base als valors dels paràmetres k_{cat} , K_M i $\Delta\Delta G^\ddagger$. La $\Delta\Delta G^\ddagger$ s'avalua a partir del valor de k_{cat}/K_M aplicant l'equació 4.2, que pren com a referència l'enzim salvatge. Mentre que la comparació de K_M dona idea dels efectes de la mutació en la formació del complex de Michaelis, els efectes en l'estat de transició es mesuren en base als canvis en la $\Delta\Delta G^\ddagger$, que també queden recollits a la taula 4.5.

En el cas del mutant Y152F, en què s'ha eliminat el grup hidroxil que suposadament forma pont d'hidrogen amb l'hidroxil a C2, s'observa una gran estabilització tant de l'estat fonamental, amb una disminució de K_M de 5 vegades respecte de l'enzim salvatge, com de l'estat de transició amb una $\Delta\Delta G^\ddagger$ de $-0.48 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Com la k_{cat} del mutant és inferior a la de l'enzim salvatge, l'estabilització de l'estat de transició pot atribuir-se principalment a un efecte en la unió del substrat. Ara bé, el paràmetre K_M no sempre es correspon amb la constant de dissociació enzim-substrat lligada a l'etapa de formació del complex de Michaelis, sinó que en la seva definició estan presents tots els complexos enzim-lligand que es formen a partir de la unió bimolecular E+S (incloent-hi la unió de tercers compostos), i tenen una aportació significativa aquells que es troben en concentracions apreciables a l'estat estacionari. A l'equació 4.3 s'expressa el

paràmetre K_M en funció de les diferents espècies enzimàtiques presents en un model de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva per substrat.

$$K_M = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES] + [EP]} \quad \text{Equació 4.3.}$$

En aquest cas, a més del complex de Michaelis, això inclou l'intermedi covalent. Per tal de determinar la importància del mateix en el valor de la K_M , es decideix realitzar una anàlisi de Hammett qualitativa del mutant Y152F amb tres substrats diferents, sent el G4G3G-MU un d'ells. Els altres dos substrats escollits són dos substrats més activats per a la hidròlisi, el G4G3G-2,4DNP (**28**) i el G4G3G-3,4DNP (**21**) (figura 4.10), de manera que es pugui avaluar la importància de l'etapa de desglicosidació en el mecanisme. Si la desglicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció en la hidròlisi del G4G3G-MU, també ho serà per als dos substrats més activats, i en conseqüència, com la velocitat de l'etapa de desglicosidació no depèn de la naturalesa de la part aglicònica del substrat, no s'hauria d'observar dependència del paràmetre cinètic k_{cat} amb el pK_a de l'aglicona cromofòrica. En la taula 4.6 es presenten els resultats de k_{cat} i k_{cat}/K_M obtinguts en els ajusts, així com dels seus logaritmes, que són els que estan representats en els gràfics de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M en funció del pK_a de l'aglicona (figura 4.11). A nivell comparatiu es mostren també les anàlisis de Hammett corresponents per a l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa amb aquests tres substrats (figura 4.12), per als que l'etapa determinant de la velocitat de reacció és la glicosidació (capítol 6).

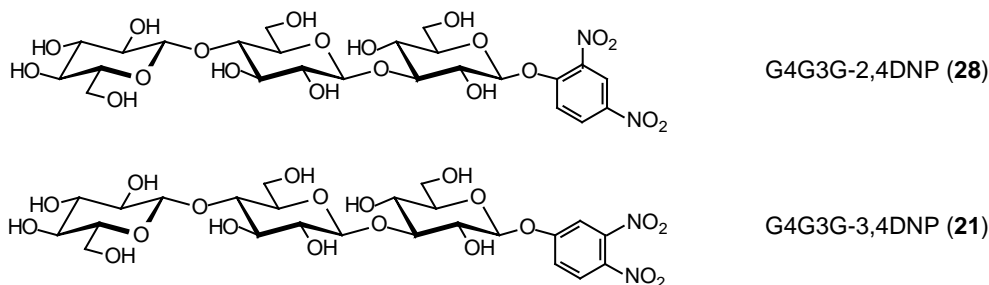


Figura 4.10. Substrats sintètics de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* que es fan servir per tal de realitzar les anàlisis de Hammett qualitatives del mutant Y152F.

Taula 4.6. Paràmetres cinètics k_{cat} i k_{cat}/K_M , obtinguts en l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten, per a la hidròlisi dels substrats G4G3G-MU, G4G3G-3,4DNP i G4G3G-2,4DNP per part del mutant Y152F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. A la taula es presenten, a més, els logaritmes d'aquests paràmetres cinètics i els pK_a de les aglicones dels tres substrats emprats. Condicions experimentals: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM $CaCl_2$, pH 7.2 i 30 °C.

Aglicona	pK_a	k_{cat} / s^{-1}	$(k_{cat}/K_M) / s^{-1} \cdot mM^{-1}$	$\log(k_{cat})$	$\log(k_{cat}/K_M)$
MU	7.36	0.261 ± 0.007	1.5 ± 0.1	-0.58	3.17
3,4DNP	5.36	15.3 ± 0.3	70 ± 5	1.18	4.84
2,4DNP	3.96	250 ± 10	2500 ± 600	2.40	6.40

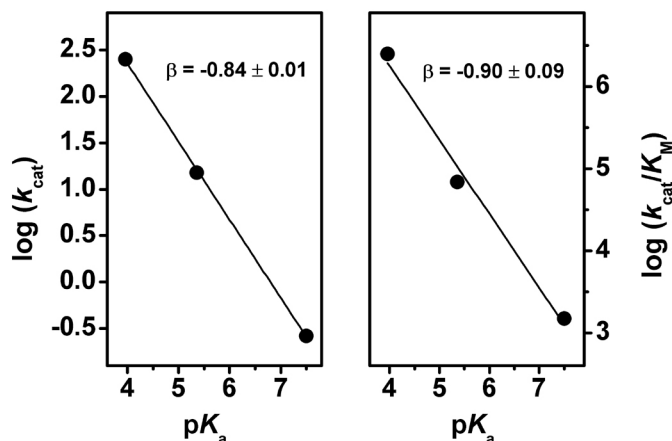


Figura 4.11. Gràfics de Hammett en k_{cat} i k_{cat}/K_M del mutant Y152F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a pH 7.2 i 30 °C. En els gràfics es representa el logaritme del paràmetre cinètic k_{cat} o k_{cat}/K_M enfront del pK_a de l'aglicona. A l'interior del gràfic es mostra el pendent de l'ajust.

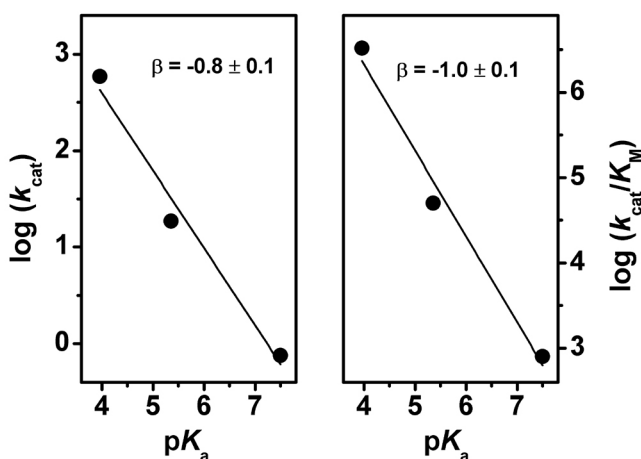


Figura 4.12. Gràfics de Hammett en k_{cat} i k_{cat}/K_M de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a pH 7.2 i 30 °C. En els gràfics es representa el logaritme del paràmetre cinètic k_{cat} o k_{cat}/K_M enfront del pK_a de l'aglicona. A l'interior del gràfic es mostra el pendent de l'ajust.

Es comprova que per als dos enzims la velocitat d'hidròlisi augmenta amb el pK_a de l'aglicona, rendint per al mutant Y152F pendents de -0.84 i -0.9 en les anàlisis de Hammett en k_{cat} i en k_{cat}/K_M , respectivament. Aquests valors són molt semblants als obtinguts en el cas de l'enzim salvatge. En el cas dels dos enzims es pot concloure que la similitud entre les dues anàlisis de Hammett, així com el valor del pendent indiquen que la glicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció per al conjunt de substrats emprat, minimitzant d'aquesta manera la presència de l'intermedi de reacció.

Sembla per tant, que la K_M és representativa de l'etapa de formació del complex enzim-substrat en el cas del mutant Y152F i que l'eliminació del grup hidroxil comporta realment una millora significativa en l'etapa de formació del complex de Michaelis. El

fet que l'eliminació del grup hidroxil de la Tyr152 comporti una millora i no un empitjorament de la unió en l'estat fonamental, i no provoqui canvis en l'estabilització de l'estat de transició, concorda amb les dades obtingudes amb la β -glucanasa de *Bacillus macerans*, i qüestiona la bondat del modelatge obtingut amb l'hexasacàrid, segons el qual la pèrdua del pont d'hidrogen entre l'hidroxil a C2 i la tirosina 152 hauria de provocar un empitjorament de la unió enzim-ligand, que molt possiblement s'observaria tant a l'estat fonamental com en l'estat de transició.

El cas del mutant Y152A és diferent, ja que en eliminar tot el grup fenol la K_M no varia significativament respecte de la de l'enzim salvatge però el valor de k_{cat}/K_M és més de deu vegades inferior. Això indica que l'eliminació del residu mutat desestabilitza l'estat de transició de forma significativa. I donat que l'única diferència entre el mutant Y152F i el mutant Y152A és el grup aromàtic que s'elimina, sembla que l'esmentada desestabilització pugui anar lligada a un posicionament incorrecte del nucleòfil, impeding que aquest realitzi el seu atac amb eficiència. De fet, s'ha observat en diverses ocasions que en les glicosidases el correcte posicionament del residu que fa el paper de nucleòfil és molt important, inclús més que no pas el del residu que fa d'àcid/base general [328, 373, 374].

4.6.4. Cinètiques de reacció de l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb un substrat natural de l'enzim, el β -glucà d'ordi

Per tal d'aprofundir en l'estudi de la interacció de la Tyr152, es decideix avaluar les cinètiques d'hidròlisi d'un dels substrats naturals de la 1,3-1,4- β -glucanasa, el β -glucà d'ordi, amb els tres enzims. En aquest cas, les cinètiques se segueixen en discontinu fent servir l'assaig d'extrems reductors de Somogyi-Nelson [375, 376].

A la taula 4.7 es presenten els paràmetres cinètics obtinguts en l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten als resultats obtinguts en les cinètiques, que es mostren en la figura 4.13. Es comprova que en aquest cas, la K_M es manté bàsicament igual, independentment de l'enzim utilitzat, indicant que les mutacions no afecten significativament la unió del substrat. Per tal de poder realitzar aquesta comparació s'ha assumit que la glicosidació és l'etapa determinant de la velocitat d'hidròlisi del substrat natural per part dels tres enzims, tot i que no es pot saber amb certesa si és així, ja que els valors de k_{cat} obtinguts amb el β -glucà estan per sobre dels obtinguts amb el G4G3G-2,4DNP, que és el substrat sintètic més actiu amb el que s'ha treballat.

Taula 4.7. Paràmetres cinètics obtinguts en l'ajust del model de Michaelis-Menten a les dades obtingudes en la hidròlisi del β -glucà d'ordi amb l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en tampó 30 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.2 i 30 °C. $\Delta\Delta G^\ddagger = -R \cdot T \cdot \ln[(k_{cat}/K_M)_{mutant}/(k_{cat}/K_M)_{wt}]$.

Enzim	k_{cat} / s^{-1}	$K_M / mg \cdot mL^{-1}$	$(k_{cat}/K_M) / mL \cdot s^{-1} \cdot mg^{-1}$	$\Delta\Delta G^\ddagger / kcal \cdot mol^{-1}$
wt	880 ± 50	0.5 ± 0.1	1800 ± 500	-----
Y152F	470 ± 10	0.47 ± 0.04	1000 ± 100	0.4 ± 0.2
Y152A	59 ± 1	0.39 ± 0.03	150 ± 10	1.5 ± 0.2

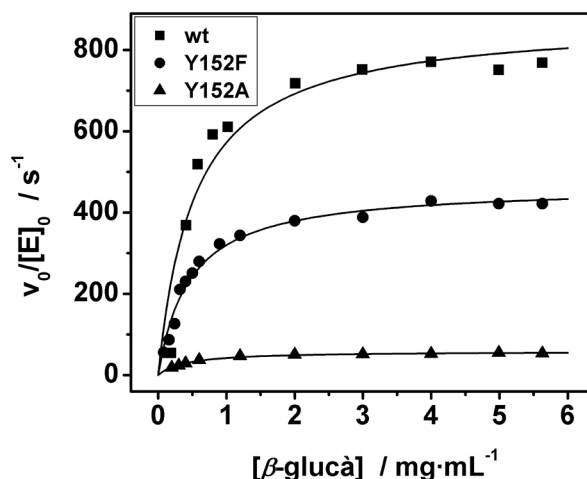


Figura 4.13. Cinètiques d'hidròlisi del β -glucà d'ordi amb l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en tampó 30 mM fosfat, 0.1 mM CaCl_2 , pH 7.2 i 30 °C. A la gràfica es representa la $v_0/[E]_0$ enfront de la concentració de substrat i es mostra l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten als resultats obtinguts.

Semblaria doncs, que els resultats obtinguts en la hidròlisi del G4G3G-MU amb el mutant Y152F poden ser conseqüència del fet d'emprar una aglicona diferent de la del substrat natural. De fet, la part aglicònica del substrat sintètic té un component hidrofòbic important que no té l'aglicona del substrat natural (figura 4.14). Com ja s'ha esmentat abans, és possible que en eliminar el grup hidroxil de la Tyr152 s'estableixi una interacció per apilament hidrofòbic entre la fenilalanina i la metilumbel·liferona, que fa canviar el seu posicionament, i que no és tan important quan l'aglicona és un anell de glucopiranososa. Tot i que les interaccions entre una piranososa i un residu aromàtic són interaccions estabilitzants, descrites amb freqüència en proteïnes que uneixen carbohidrats [17, 377], i que poden arribar a donar lloc a energies lliures d'unió d'aproximadament $1.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ [378], també és cert que l'energia associada a les interaccions per apilament hidrofòbic, que són altament dependents de la naturalesa del lligand, poden en alguns casos arribar a ser superiors [379, 380]. Així doncs, aquest canvi d'interacció en el subseti +1, que possiblement es tradueix alhora amb un grau de distorsió diferent en el subseti -1, pot ser el causant de la gran millora d'afinitat que presenta el mutant Y152F pel substrat sintètic enfront del substrat natural. Un altre argument a favor d'aquesta hipòtesi és que aquesta interacció sembla desaparèixer en el mutant Y152A, en el que s'ha eliminat l'anell aromàtic, i la K_M d'aquest mutant és molt similar a la de l'enzim salvatge, tant si s'empra com a substrat el β -glucà, com si s'empra el G4G3G-MU.



R: fragment de cadena polisacàridica

Figura 4.14. Estructura de la part aglicònica que ocupa el subseti +1 en el cas del substrat sintètic (dreta) i del substrat natural (esquerra), que són la 4-metilumbel·liferona i una unitat de D-glucopiranososa, respectivament.

Pel que fa a l'estat de transició en el cas dels dos mutants s'observa una desestabilització, que pren un valor de $0.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ en el cas del Y152F i de $1.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ per al Y152A. Aquests valors indiquen que la tirosina 152 juga un paper en l'estabilització de l'estat de transició. Comparant aquests valors amb els obtinguts fent servir el substrat sintètic **18** es comprova que per al mutant Y152A els resultats són els mateixos, i d'entrada sembla que els resultats obtinguts amb el mutant Y152F són oposats, ja que en el cas del substrat sintètic l'efecte de la mutació en k_{cat}/K_M és estabilitzant. S'ha de tenir present que en la definició del paràmetre k_{cat}/K_M entren en joc tant el valor de la k_{cat} com el de la K_M , i en les cinètiques del mutant Y152F amb el substrat sintètic, el fet que la K_M sigui cinc vegades inferior a la de l'enzim salvatge, mentre que la k_{cat} només és dos vegades inferior, fa que la K_M sigui el paràmetre que té més pes en el valor final del paràmetre k_{cat}/K_M , fent que per al mutant, aquest valor sigui superior (figura 4.15). Ara bé, l'efecte de la mutació Y152F en k_{cat} és similar en el cas dels dos substrats, amb una disminució d'aproximadament la meitat respecte de la de l'enzim salvatge. És possible que aquest mutant en el complex de Michaelis amb el trisacàrid **18** estabilitzi una estructura distorsionada més semblant a la de l'estat de transició; d'aquí la seva major afinitat per substrat, que també es tradueix en una estabilització addicional de l'estat de transició.

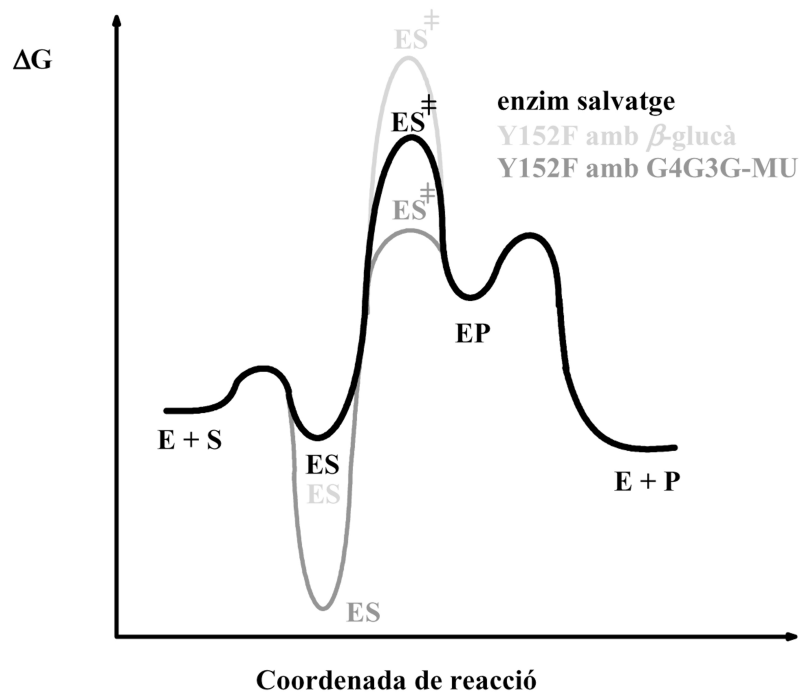


Figura 4.15. Diagrama d'energies per al mutant Y152F respecte de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en el que es mostra que a través d'una estabilització molt important del complex de Michaelis s'arriba a una estabilització addicional de l'estat de transició en el cas del substrat G4G3G-MU, que no es dona en el cas del substrat natural.

4.6.5. Estudis d'inhibició

Una altra forma d'avaluar les interaccions enzim-ligand és a través d'estudis d'inhibició. Si l'inhibidor s'uneix al centre actiu de l'enzim, com més s'assembli l'estructura de l'inhibidor a alguna de les formes que adopta el substrat al llarg de la coordenada de reacció, millor descriurà les interaccions que es donen en aquella etapa de reacció en concret. Per tal d'avaluar la interacció amb l'hidroxil a C2 es realitzen estudis d'inhibició amb el trisacàrid G4G3G, que ahora és un dels productes de reacció de la hidròlisi del G4G3G-MU. Estudis anteriors realitzats al Laboratori de Bioquímica de l'IQS ja havien determinat que el trisacàrid G4G3G es comporta com un inhibidor competitiu de l'enzim salvatge, competint amb el substrat pel centre d'unió [223]. Donat que la seva conformació en solució és la mateixa que la del substrat, la finalitat de l'estudi d'inhibició és la d'avaluar els canvis que es produeixen en les interaccions de l'extrem no reductor en el complex de Michaelis en mutar la tirosina 152.

4.6.5.1. Determinació de les constants d'inhibició de l'enzim salvatge, i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4-β-glucanasa de Bacillus licheniformis

Els estudis d'inhibició de la 1,3-1,4-β-glucanasa es realitzen avaluant la disminució de velocitat deguda a la presència de quantitats creixents d'inhibidor a diferents concentracions de substrat. La determinació de la velocitat de reacció es realitza per seguiment de l'alliberament de la 4-metilumbel·liferona en la hidròlisi del G4G3G-MU en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.2, força iònica 0.2 M, a 30 °C. El valor de la constant d'inhibició s'obté per regressió lineal multivariable fent servir la dependència de l'invers de la velocitat inicial de reacció amb la concentració d'inhibidor, en què les variables són 1/[S] i [I]/[S] d'acord amb l'equació 4.4. A la figura 4.16 es presenten els resultats de les cinètiques i els ajusts realitzats.

$$\frac{[E]_0}{v_0} = \frac{1}{k_{cat}} + \frac{K_M}{k_{cat}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{K_M}{k_{cat} \cdot K_I} \cdot \frac{[I]}{[S]} \quad \text{Equació 4.4.}$$

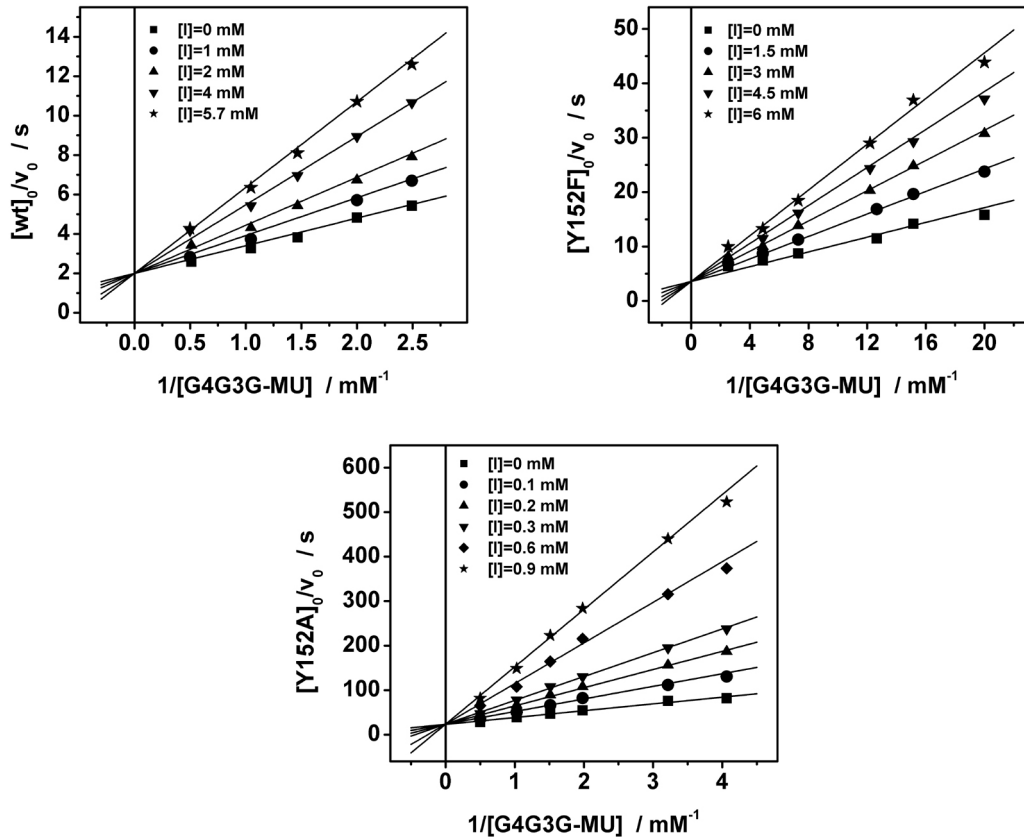


Figura 4.16. Representacions de Lineweaver-Burk de l'ajust del model d'inhibició competitiva als resultats de les cinètiques dels tres enzims fent servir G4G3G-MU com a substrat i G4G3G com a inhibidor. Els gràfics corresponen a l'enzim salvatge (superior esquerre), el mutant Y152F (superior dret) i el mutant Y152A (inferior) de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*. La peculiaritat d'aquesta representació és que per al model d'inhibició competitiva les rectes es tallen a l'eix d'ordenades. Les cinètiques es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.2, força iònica 0.2 M, a 30 °C; i en els gràfics es representa [E]₀/v₀ enfront de 1/[S].

Les constants d'inhibició obtingudes en el cas dels tres enzims es presenta a la taula 4.8, en què també s'indica la variació en la ΔG_{unió}, prenent com a referència la K_I de l'enzim salvatge: ΔΔG_{unió} = -R·T·ln[1/(K_{I, mut}/K_{I, wt})].

Taula 4.8. Constants d'inhibició obtingudes en la regressió lineal multivariable associada a l'equació 4.4, per a l'enzim salvatge, i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*, també s'indica la ΔΔG_{unió}. ΔΔG_{unió} = -R·T·ln[1/(K_{I, mut}/K_{I, wt})]. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.2, força iònica 0.2 M, 30 °C.

Enzim	K _I / mM	ΔΔG _{unió} / kcal·mol ⁻¹
wt	2.7 ± 0.4	-
Y152F	2.86 ± 0.08	0.1 ± 0.1
Y152A	0.125 ± 0.003	-1.8 ± 0.1

S'observa que el fet d'eliminar l'hidroxil en el mutant Y152F, no suposa una variació significativa sobre la constant d'inhibició, però que el mutant Y152A uneix l'inhibidor molt millor que l'enzim salvatge, que es tradueix en una estabilització de la unió de -1.8 kcal·mol⁻¹. Per tal de tenir una idea de la contribució entàlpica i entròpica a l'energia d'unio es fan les mateixes cinètiques d'inhibició a dues temperatures més, tant amb l'enzim salvatge com amb el mutant Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa. A la taula 4.9 es presenten les constants d'inhibició obtingudes a les diferents temperatures. De la relació lineal del logaritme de l'invers de les constants d'inhibició amb l'invers de la temperatura s'obtenen aquestes contribucions per als dos enzims (equació 4.5, figura 4.17, taula 4.10).

Taula 4.9. Constants d'inhibició obtingudes per regressió lineal multivariable aplicant l'equació 4.4, a les cinètiques d'inhibició obtingudes fent servir el substrat G4G3G-MU i l'inhibidor G4G3G, en el cas de l'enzim salvatge i el mutant Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a les temperatures indicades a la taula. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.2, força iònica 0.2 M, a una temperatura T.

Temperatura	K_I wt / mM	K_I Y152A / mM
20 °C	1.4 ± 0.1	0.06 ± 0.01
30 °C	2.7 ± 0.4	0.125 ± 0.003
45 °C	6.5 ± 0.9	0.4 ± 0.1

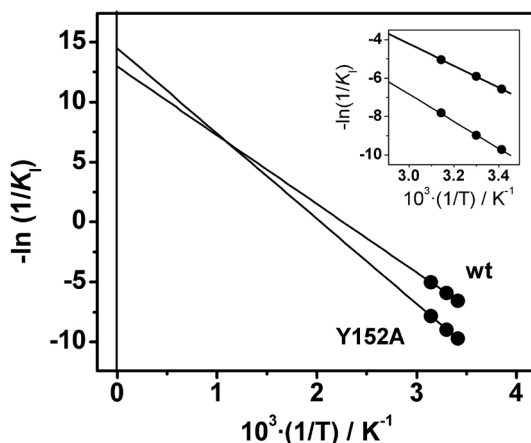


Figura 4.17. Gràfic en el que es representa el $-\ln(1/K_I)$ enfront de l'invers de temperatura. El pendent permet obtenir el valor de ΔH , mentre que l'ordenada a l'origen aporta informació sobre la contribució entròpica (equació 4.5).

$$-\ln\left(\frac{1}{K_I}\right) = \frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} - \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equació 4.5.}$$

Taula 4.10. Valors de ΔH i ΔS per a la unió de l'inhibidor G4G3G al centre actiu de l'enzim salvatge i del mutant Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Condicions de reacció: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl_2 , pH 7.2, força iònica 0.2 M, substrat G4G3G-MU.

Enzim	$\Delta H / \text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta S / \text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
wt	-11.4 ± 0.1	-25.8 ± 0.4
Y152A	-14.1 ± 0.5	-29 ± 2

Per als dos enzims s'obté una ΔS similar, si bé la contribució entròpica és una mica superior en el cas del mutant, i una ΔH de $-11.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ per a l'enzim salvatge i de $-14.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ per al mutant Y152A. Això comporta una $\Delta\Delta H_{\text{unió}}$ entre el mutant i l'enzim salvatge de $-2.7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, directament atribuïble a un enfortiment de les interaccions amb l'inhibidor en el mutant Y152A respecte de les interaccions que es donen en l'enzim salvatge, i molt possiblement associada a la interacció entre el nucleòfil i l'hidroxil a C2.

4.6.5.2. Dependència de la inhibició per producte en funció del pH

Per tal d'aprofundir en la interacció per pont d'hidrogen entre el nucleòfil i l'hidroxil a C2 es decideix ampliar l'estudi d'inhibició a altres pH en què el nucleòfil no estigui en la forma ionitzada. D'aquesta manera, es passaria de tenir una interacció per pont d'hidrogen amb un residu carregat, a tenir-ne una amb un residu neutre, cosa que faria disminuir significativament l'energia associada a la interacció. Tant el valor de la constant d'inhibició com la seva dependència amb la temperatura indiquen que la interacció que es pretén valorar és més important en el cas del mutant Y152A que no en el cas de l'enzim salvatge. De manera que si realment es tracta del pont d'hidrogen amb el nucleòfil, seria d'esperar una variació major d'aquesta interacció en el cas del mutant que no en el cas de l'enzim salvatge. Per tal de realitzar l'experiment, es pren com a referència el valor del $\text{p}K_a$ del nucleòfil en l'enzim lliure. Per a l'enzim salvatge aquest $\text{p}K_a$ és de 5.36, i per tant es decideix treballar a pH 5.0 (que ja seria suficient per tal de tenir la major part del Glu134 en la seva forma àcida). A pH 5.0 però, en el mutant Y152A poc més de la meitat de l'enzim tindria el nucleòfil en la forma no ionitzada ja que el seu $\text{p}K_a$ és de 5.06. Per tal d'assegurar que el nucleòfil estigui en la seva forma àcida en els dos enzims es decideix treballar també a pH 3.0, prèvia comprovació de l'estabilitat de tots dos enzims a aquest pH durant el temps d'assaig. Per a l'enzim salvatge s'ha realitzat també un darrer experiment d'inhibició a pH 4.0.

A la figura 4.18 es mostren les representacions de Lineweaver-Burk de les cinètiques obtingudes amb l'inhibidor G4G3G per a l'enzim salvatge i el mutant Y152A a pH 5.0 i 3.0. A la figura 4.19 es fa servir, per a major claredat, un gràfic de Dixon (en el que es representa $[E]_0/v_0$ enfront de la concentració d'inhibidor) per tal de representar els resultats obtinguts a pH 4.0 per a l'enzim salvatge. En la representació de Dixon es generen una sèrie de rectes, creixents amb la concentració d'inhibidor, que es tallen a un valor de $-K_I$ en el cas de la inhibició competitiva, i que són paral·leles en el cas de la inhibició acompetitiva, amb un punt de tall amb l'eix d'abcises que es correspon amb el valor de $-K_I(1+K_M/[S])$, és a dir, que tendiria a $-K_I$ per a valors de $[S] \gg K_M$.

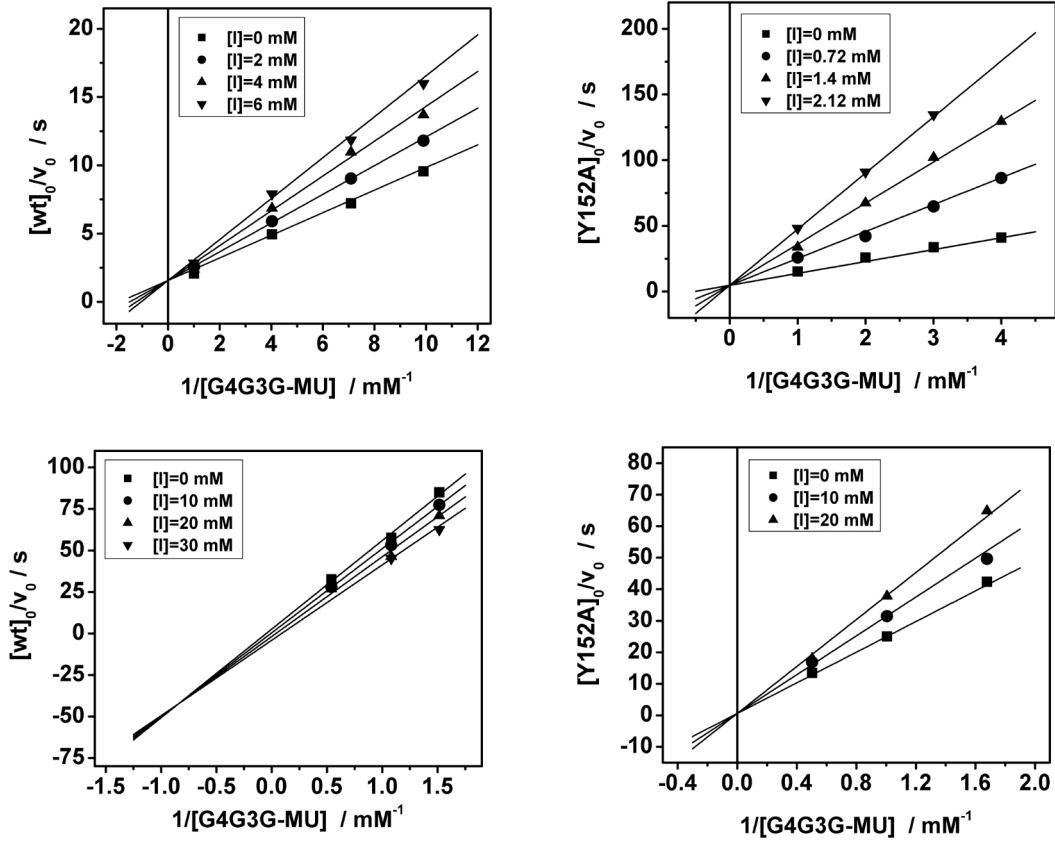


Figura 4.18. Representacions de Lineweaver-Burk dels ajusts dels resultats de les cinètiques de l'enzim salvatge (esquerra) i del mutant Y152A (dreta) de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, fent servir G4G3G-MU com a substrat i G4G3G com a inhibidor, a dalt: pH 5.0, a baix: pH 3.0. En els gràfics es representa $[E]_0/v_0$ enfront de $1/[S]$. Les cinètiques es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl_2 , força iònica 0.2 M, a 30 °C.

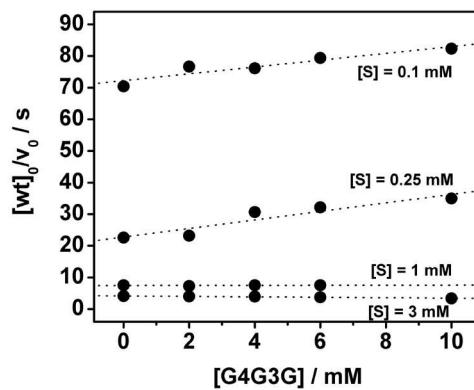


Figura 4.19. Representació de Dixon de l'ajust dels resultats de les cinètiques de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, fent servir G4G3G-MU com a substrat i G4G3G com a inhibidor a pH 4.0. En els gràfics es representa $[E]_0/v_0$ enfront de $[I]$. Les cinètiques es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, pH 4.0, 0.1 mM CaCl_2 , força iònica 0.2 M, a 30 °C.

A la vista de les figures 4.18 i 4.19 es fa palesa una diferència important de comportament entre l'enzim salvatge i el mutant Y152A. Mentre que per al mutant l'oligosacàrid G4G3G actua sempre com a inhibidor competitiu, per a l'enzim salvatge el comportament varia en funció del pH. A pH 5.0 es comporta com a inhibidor competitiu, de la mateixa manera que ho fa a pH 7.2, però a pH 3.0, es comprova que la velocitat de reacció augmenta en augmentar la concentració de G4G3G, que és indicatiu d'activació i no pas d'inhibició. Finalment a un pH intermedi de 4.0 s'observa un comportament mixte en funció de la concentració de substrat emprada. A concentracions de substrat més elevades, amb pendents pràcticament nuls, sembla que no hi hagi inhibició, i a concentracions baixes de substrat el comportament s'aproparia més al d'un inhibidor acompetitiu que no pas al d'un inhibidor competitiu.

Els resultats obtinguts amb l'enzim salvatge obliguen a fer un replantejament del tipus d'unió que es deu donar. A pH superiors a 5.0 s'observa inhibició competitiva i s'ha assumit que el G4G3G s'uneix als subestis de l'extrem no-reductor del centre actiu de l'enzim, competint directament amb la unió del substrat. A pH 4.0 sembla que aquesta inhibició deixa de ser competitiva i passa a ser d'acompetitiva a nul·la en funció de la concentració de substrat; i a pH 3.0, ja no s'observa inhibició i, en comptes, en presència del G4G3G, s'observa activació. Per tal d'actuar com a activador o bé el trisacàrid s'uneix a la β -glucanasa en un centre d'unió fora del centre actiu, o bé s'uneix al centre actiu de l'enzim sense competir amb el substrat, fent, en qualsevol dels casos, l'enzim més eficient. Pel que fa a l'existència d'un segon seti d'unió de substrat, una inspecció de l'estructura tridimensional de la proteïna indica que si aquest lloc existeix, seria més un punt d'ancoratge que no altra cosa, ja que no hi ha cap estructura clara que pugui satisfer aquest propòsit. La segona opció, que suposa la unió compatible del G4G3G i el substrat al centre actiu, tot i que més improbable, tampoc pot descartar-se.

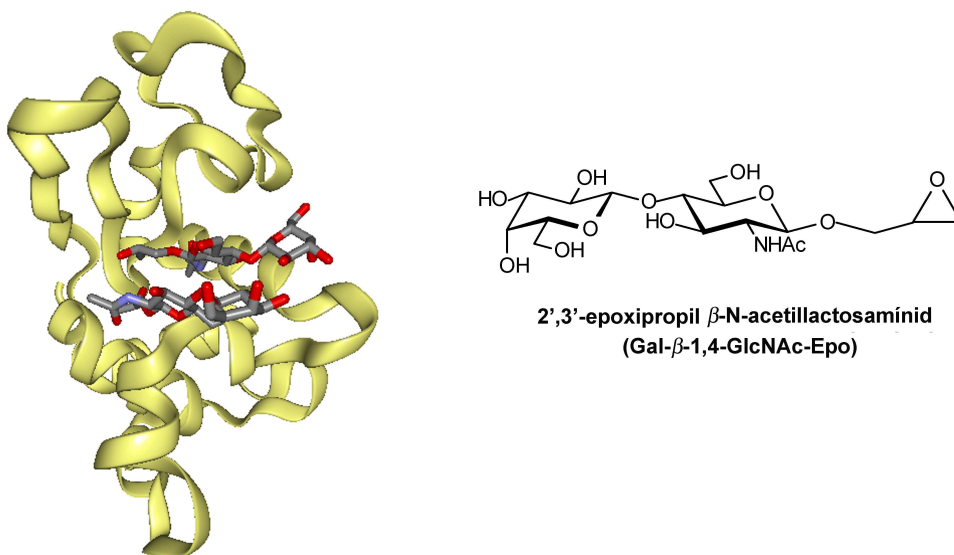
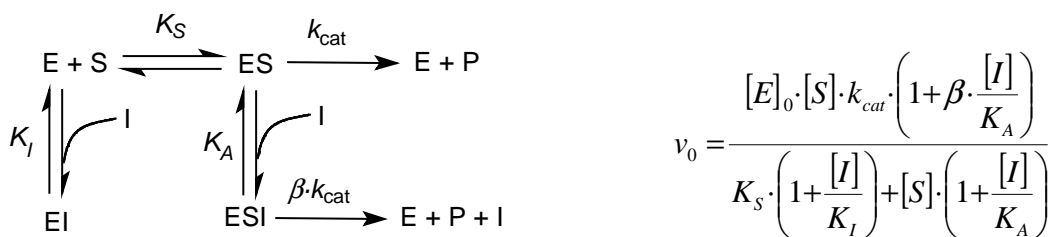


Figura 4.20. Estructura d'un complex del lisozim humà amb l'inhibidor epòxid Gal- β -1,4-GlcNAc-Epo que ha cristal·litzat amb dues molècules d'inhibidor unides al centre actiu [381].

De fet, en l'estudi de l'estructura de diferents complexos que estableixen el lisozim humà i el de clara d'ou amb diferents lligands es va observar la formació d'un complex

ternari, en què dues molècules de l'inhibidor 2',3'-epoxipropil β -*N*-acetillactosamínid (Gal- β -1,4-GlcNAc-Epo) (figura 4.20), s'uneixen al centre actiu de l'enzim, establint una xarxa de ponts d'hidrogen i interaccions de van der Waals entre elles i amb l'enzim [381, 382]. Ara bé, no hi ha cap evidència que es donin estructures similars amb el substrat, i encara quedaria el dubte de si aquestes serien catalíticament actives. A banda d'aquesta opció, també cal considerar que l'inhibidor s'uneixi a l'enzim en els subseis generalment ocupats per l'extrem reductor del substrat, després de l'alliberament de l'aglicona, de forma similar al que succeeix durant la reacció de transglicosidació.

Aquest no és el primer cas en què els resultats apunten a la formació d'un complex ternari en el cas de la β -glucanasa. De fet, en nombroses cinètiques s'observa inhibició acompetitiva per substrat, que comporta la unió simultània de dues molècules de substrat per tal de formar un complex ternari ES₂. I en el cas de les cinètiques en estat preestacionari també es postula la unió d'una segona molècula de substrat (capítol 5). La novetat que aporten aquests resultats és que, perquè la unió del trisacàrid comporti una activació enzimàtica, el complex ternari ESI format amb el trisacàrid ha de ser actiu. Integrant aquest fenomen d'activació no essencial al mecanisme amb inhibició competitiva que descriu el comportament de l'enzim salvatge a pH superiors a 5.0 s'arriba a proposar el model que es presenta a la figura 4.21. En aquest model l'enzim presenta les dues branques corresponents al mode d'unió competitiu i acompetitiu observats, i el complex ternari presenta activitat. Es postula que la 1,3-1,4- β -glucanasa presenta en tot moment aquestes dues branques, però que la importància relativa de les mateixes, que està definida per la relació de constants K_I , K_A i β , depèn del pH. Així, a pH 5.0 o superiors, la inhibició competitiva és la més important, mentre que a mesura que es disminueix el pH la branca que comporta l'activació no essencial va prenent més pes. A un punt intermedi, en una mateixa cinètica es podria arribar a veure com a determinades concentracions de substrat una mateixa concentració d'inhibidor passa d'inhibir l'enzim, a activar-lo. De fet, aquest canvi és el que s'observa en les cinètiques realitzades a pH 4.0 en què es veu que al voltant d'una concentració de substrat entre 1 i 3 mM, desapareix la inhibició, i segurament a concentracions de substrats superiors s'hagués observat activació.



Equació 4.6.

Figura 4.21. Esquema general del model d'activació no essencial amb inhibició competitiva, amb l'equació de velocitat associada.

El canvi de comportament en l'enzim salvatge en funció del pH dificulta la valoració de l'efecte del canvi de l'estat d'ionització del nucleòfil en la seva interacció amb l'hidroxil a C2. Tot i així, els resultats obtinguts a pH 7.2 i 5.0 mostren una tendència, en la que s'observa que la interacció competitiva amb l'inhibidor s'afebleix en disminuir el pH. A la taula 4.11 es presenten els valors de les constants d'inhibició/activació per a l'enzim salvatge i el mutant Y152A obtingudes als diferents

pH. El valor de la constant d'activació s'obté per regressió lineal multivariable fent servir l'equació 4.7 conforme al model d'activació no essencial.

$$\frac{v_0}{[E]_0} = \frac{k_{cat}}{K_M} \cdot [S] + \frac{k_{cat} \cdot \beta}{K_M \cdot K_A} \cdot [S] \cdot [I] - \frac{1}{K_M} \cdot \frac{v_0}{[E]_0} \cdot [S] - \frac{1}{K_M \cdot K_A} \cdot \frac{v_0}{[E]_0} \cdot [S] \cdot [I] \quad \text{Equació 4.7.}$$

Taula 4.11. Resultats dels estudis d'inhibició amb l'enzim salvatge i el mutant Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a 30 °C, emprant com a substrat el G4G3G-MU i com a inhibidor el G4G3G a diferents pH. Per a cada enzim s'indica el valor de la K_I , obtinguda per regressió lineal multivariable aplicant l'equació 4.4, als diferents pH emprats, i de la K_A (constant d'activació) obtinguda per a l'enzim salvatge a pH 3.0 aplicant l'equació 4.7. Les reaccions es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, I = 0.2 M.

Enzim	pH	K_I / mM	K_A / mM
wt	7.2	2.7 ± 0.4	----
wt	5.0	7.4 ± 0.6	----
wt	3.0	----	70 ± 30
Y152A	7.2	0.125 ± 0.009	----
Y152A	5.0	0.57 ± 0.04	----
Y152A	3.0	37 ± 3	----

La tendència proposada per a l'enzim salvatge s'observa clarament en el mutant Y152A, amb un augment continuat del valor de la constant d'inhibició en disminuir el pH. Aquests resultats permeten extreure la primera conclusió interessant: hi ha algun/s grup/s implicats en la unió de l'inhibidor que es valora/en a un pH al voltant del marge de pH estudiat, i que aquesta interacció és més important quan el grup està en la seva forma bàsica. De moment, i fent l'assumpció que només s'està valorant una interacció, aquesta primera conclusió apunta que el nucleòfil pugui ser el grup implicat.

Segonament, i com ja s'havia avançat, el canvi en la $\Delta\Delta G_{unió}$ en funció del pH és més gran en el cas del mutant Y152A que no en el cas de l'enzim salvatge, de manera que els resultats a diferents pH també són coherents amb els resultats obtinguts a diferents temperatures. A la figura 4.22 es presenta un resum de tots els resultats d'inhibició obtinguts a 30 °C, on s'observa que el pas de pH 7.2 a 5.0 comporta una $\Delta\Delta G_{unió}$ de 0.6 kcal·mol⁻¹ per a l'enzim salvatge, mentre que per al mutant Y152A és de 0.91 kcal·mol⁻¹. Tot i així, el valor obtingut per als dos enzims no pot comparar-se directament ja que el pK_a del nucleòfil és una mica diferent en cada cas i la proporció d'enzim en què el nucleòfil està en forma àcida varia. Al pH de treball hi ha un 70% d'enzim en què el nucleòfil està en forma àcida en el cas de l'enzim salvatge (pK_a = 5.36), però en el cas del mutant Y152A (pK_a = 5.06) aquesta proporció es redueix a un 53%. Ara bé, per al mutant Y152A, la comparació entre les constants d'inhibició a pH 3.0 i a pH 7.2, amb un 99% de nucleòfil en forma àcida i bàsica, respectivament, si que permet valorar directament l'efecte de la seva protonació en la unió de l'inhibidor. La $\Delta\Delta G_{unió}$ associada a aquesta disminució de pH és de 3.4 kcal·mol⁻¹. Aquest valor és compatible amb el fet que un pont d'hidrogen passi de tenir un acceptor carregat a tenir-ne un de neutre, i per tant, el canvi d'energia associat al canvi de pH podria atribuir-se

al canvi de protonació del residu que actua com a nucleòfil, i confirma la importància d'aquesta interacció en el complex enzim-inhibidor, per al mutant Y152A.

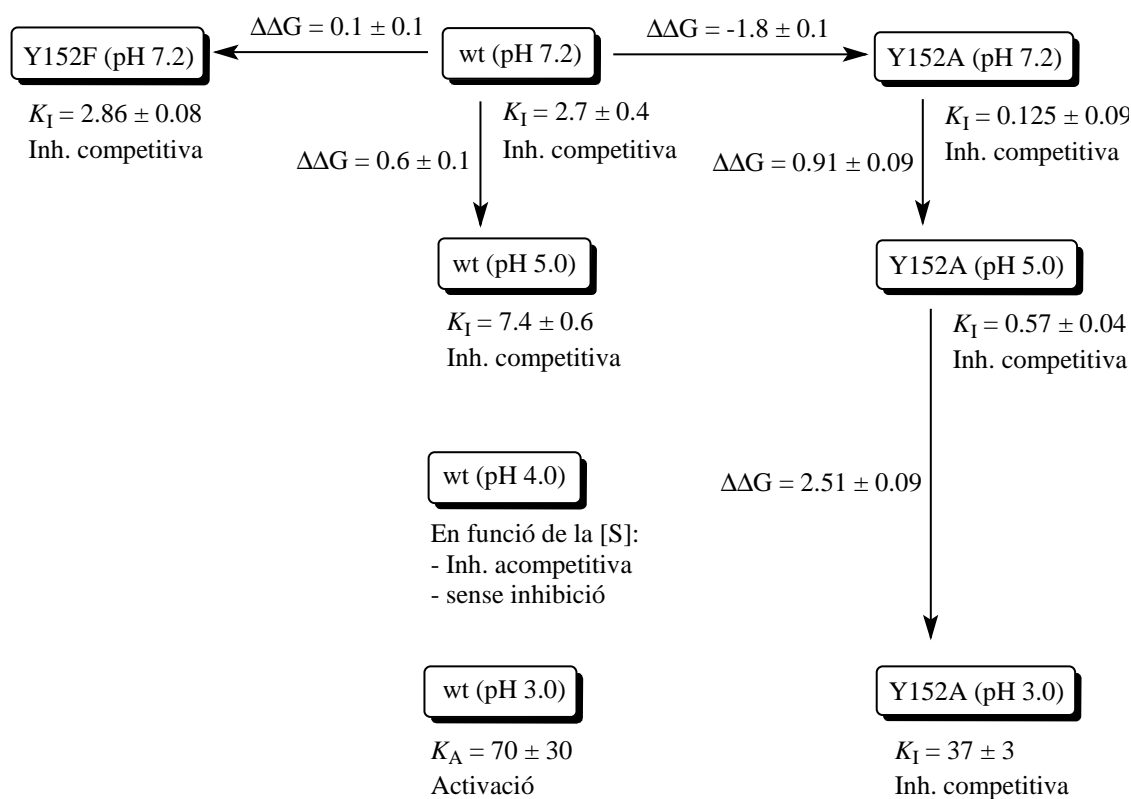


Figura 4.22. Diagrama resum dels resultats obtinguts en els estudis d'inhibició de l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* a 30 °C fent servir el substrat G4G3G-MU i l'inhibidor G4G3G. Les reaccions es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, I = 0.2 M. Les K_I (K_A) s'expressen en mM i les $\Delta\Delta G$ s'expressen en kcal·mol⁻¹. $\Delta\Delta G_{\text{unió,enzim}} = -R \cdot T \cdot \ln[1/(K_{I, \text{mutant}}/K_{I, \text{wt}})]$, $\Delta\Delta G_{\text{unió, pH}} = -R \cdot T \cdot \ln[1/(K_{I, \text{pH}}/K_{I, \text{pH 7.2}})]$.

4.6.6. Resum dels resultats d'unió obtinguts amb l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb l'inhibidor G4G3G i els substrats G4G3G-MU i β-glucà d'ordi

A les figures 4.23 i 4.25 es mostren unes estructures parcials dels tres referents estructurals que s'han fet servir en el present treball, ja sigui per al disseny d'experiències, ja sigui per a la interpretació dels resultats obtinguts. A la figura 4.23 es presenta una part del complex de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus macerans* amb l'hexasacàrid G4G4G3G4G4G [187]. L'estructura obtinguda en aquest modelatge, que va ser la que es va fer servir en el plantejament d'aquest treball, situa l'hexasacàrid al centre actiu de l'enzim ocupant tots els subsetis, amb totes les unitats de glucopiranososa en conformació ⁴C₁. Segons aquesta estructura l'hidroxil de la tirosina 152 interacciona amb l'hidroxil a C2 de la unitat de piranososa del subseti -1 i amb l'hidroxil a C3 de la piranososa que ocupa el subseti +1, mentre que el glutamat 134 està massa lluny per interaccionar amb l'hidroxil a C2.

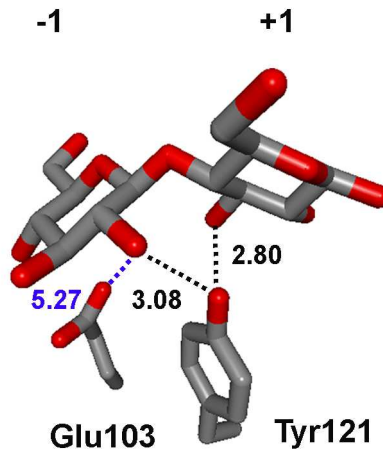


Figura 4.23. Estructura parcial dels subsetis -1 i +1 corresponent a un modelatge molecular de l'hexasacàrid G4G4G3G4G4G al centre actiu de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus macerans*. S'observen les interaccions per pont d'hidrogen que estableix la tirosina 121 amb el substrat, i que el glutamat 103 està massa lluny per exercir una interacció per pont d'hidrogen amb l'hidroxil a C2 de la unitat de piranosa que ocupa el subseti -1. La tirosina 121 i el glutamat 103 de la β -glucanasa de *Bacillus macerans* es corresponen amb la tirosina 152 i el glutamat 134 de la β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Els resultats cinètics obtinguts demostren que la interacció amb l'hidroxil a C2 no es dona, i obliguen a descartar aquest modelatge per a la interpretació posterior de les dades. A la figura 4.24 es presenta l'estructura del modelatge molecular del substrat G4G4G3G-MU al centre actiu de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* [150], en què la unitat de glucopiranososa que ocupa el subseti -1 adopta una conformació distorsionada 1S_3 .

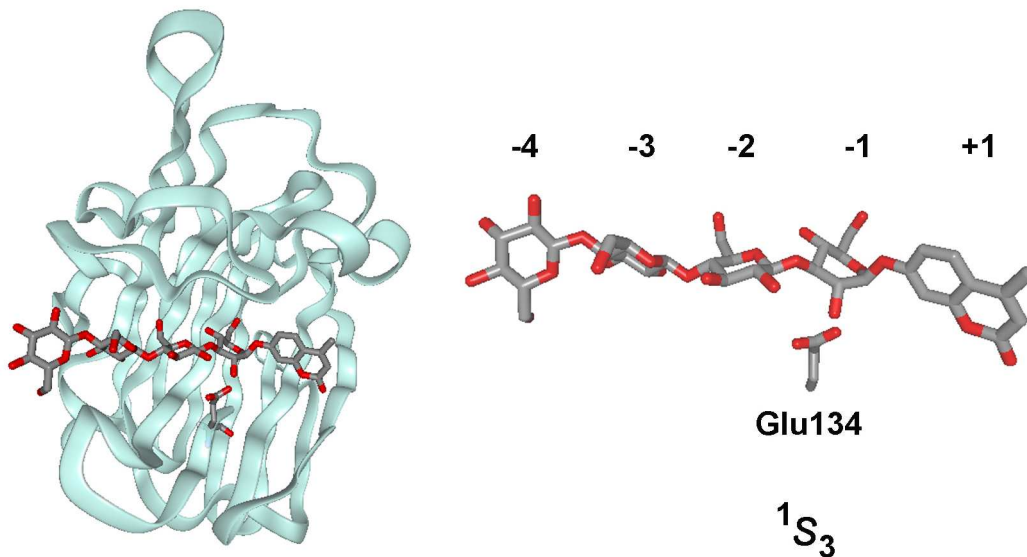


Figura 4.24. Estructura del modelatge molecular d'un complex de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G4G3G-MU. En aquest modelatge la unitat de piranosa que ocupa el subseti -1 adopta una conformació de nau torçada (*skew-boat*) 1S_3 , i l'hidroxil a C2 interacciona per pont d'hidrogen amb el Glu134.

En aquesta estructura s'observa que la distància entre l'hidroxil de la tirosina 152 i l'hidroxil a C2 és de 5.94 Å, i la distància entre aquest mateix hidroxil i el nucleòfil és de 2.71 Å (figura 4.25, esquerra). De manera que segons aquesta estructura no s'estableix una interacció per pont d'hidrogen entre l'hidroxil a C2 i la tirosina 152, però aquesta interacció sí que s'estableix amb el residu que actua com a nucleòfil. Aquesta és l'estructura que s'ha pres com a referència de l'estructura del complex de Michaelis. Finalment, a l'estructura de la dreta de la figura 4.25 es mostra una visió parcial del centre actiu de l'estructura cristal·logràfica del complex enzim-producte per al mutant Glu103Gln de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus macerans* [149]. En aquest complex s'ha observat que el tetrasacàrid G4G4G3G s'uneix al centre actiu entre els subunitis -1 i -4, amb totes les unitats de piranosa en conformació de cadira relaxada 4C_1 . En aquest cas s'observa que la distància entre l'hidroxil a C2 del subuniti -1 i el nucleòfil és de 2.79 Å, distància adequada per a una interacció per pont d'hidrogen, i que la tirosina corresponent a la 152 es troba a 5.41 Å del mateix hidroxil, massa lluny perquè es pugui establir una interacció per pont d'hidrogen entre ells.

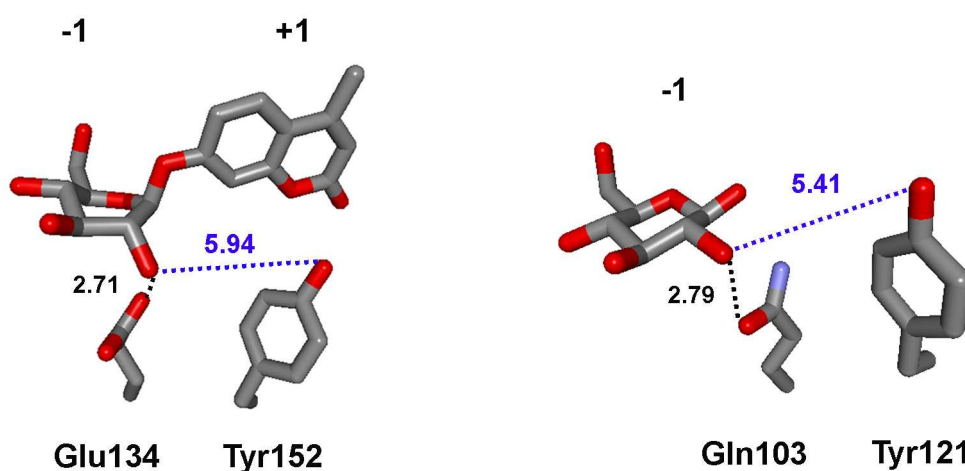


Figura 4.25. Estructures parcials corresponents als subunitis -1 i +1 del modelatge molecular del complex G4G3G-MU- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (esquerra) [150], i al subuniti -1 en el complex G4G4G3G- β -glucanasa de *Bacillus macerans* (dreta) [149]. En els dos casos s'indiquen les distàncies entre l'hidroxil a C2 del lligand i l'hidroxil de la Tyr152 (o Tyr121 en la nomenclatura de *Bacillus macerans*) i el carboxilat del Glu134 (o Glu103Gln en la nomenclatura de *Bacillus macerans*).

A l'hora d'interpretar conjuntament els diferents resultats d'unió amb els dos substrats i l'inhibidor s'observen certes discrepàncies. En base al plantejament inicial, segons el qual els estudis d'inhibició amb el G4G3G permetrien obtenir informació sobre les interaccions enzim-substrat per la banda no-reductora del mateix, els resultats de K_M i de K_I dels tres enzims haurien de seguir la mateixa tendència. A la taula 4.12 es presenta un resum dels resultats obtinguts per a aquests paràmetres a 30 °C i pH 7.2. Es comprova que en el cas del mutant Y152A, i en el del mutant Y152F amb el substrat G4G3G-MU, la tendència observada respecte de l'enzim salvatge per a aquests dos paràmetres (K_M i K_I) és ben diferent.

Taula 4.12. Constants de dissociació dels complexos de Michaelis i del complex amb l'inhibidor G4G3G per a l'enzim salvatge i els mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Les reaccions es realitzen en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, (I = 0.2 M en els estudis d'inhibició), pH 7.2 a 30 °C.

Enzim	K_M (G4G3G-MU) / mM	K_M (β -glucà) / mg·mL ⁻¹	K_I / mM
wt	0.92 ± 0.03	0.5 ± 0.1	2.7 ± 0.4
Y152F	0.18 ± 0.01	0.47 ± 0.04	2.86 ± 0.08
Y152A	1.03 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.125 ± 0.003

L'explicació podria trobar-se en l'estructura dels lligands. D'una banda l'inhibidor no té aglicona, de manera que es perden les interaccions que s'estableixen amb el substrat en el/s subseti/s +1 i +2. En aquest sentit, s'ha de tenir present la interacció d'apilament hidrofòbic entre la fenilalanina 152 i el residu 4'-metilumbel-liferil que possiblement es dona en el mutant Y152F, i que fa disminuir la K_M per a aquest substrat unes 5 vegades respecte de la de l'enzim salvatge. Ara bé, aquesta explicació per si sola queda incompleta en el cas del mutant Y152A que, amb una K_M similar a la de l'enzim salvatge per als dos substrats assajats, sembla que no exerceix interaccions de valor afegit sobre les que es donen amb l'enzim salvatge en els subsetis reductors, i tot i així, presenta una K_I per al G4G3G molt inferior a la de l'enzim salvatge. El segon tret estructural digne d'esment té a veure amb les diferents conformacions adoptades pels dos lligands al centre actiu de l'enzim, que s'han conegut recentment en el grup. A través d'uns estudis de simulacions de dinàmica molecular de la conformació que adopta el sucre dins del centre actiu de l'enzim es proposa que la unitat de glucopiranososa que ocupa el subseti -1 en el complex enzim-substrat presenta una conformació de nau torçada (*skew-boat*) ¹S₃ [150], que dista molt de la conformació de cadira ⁴C₁ adoptada pel producte de reacció en el complex enzim-G4G4G3G [149]. Aquests resultats guarden coherència amb els observats en altres complexos glicosidasa-lligand on no s'observa distorsió de la piranososa que ocupa el subseti -1 en els complexos amb el producte de reacció, mentre que en el complex de Michaelis (en què l'aglicona se situa en els subsetis que uneixen la banda reductora del sucre) s'observa distorsió d'aquesta piranososa cap a una conformació més similar a la de l'estat de transició. Així doncs, mentre que els estudis amb el substrat, i més en concret el valor de la K_M , aporten informació de les interaccions que s'estableixen amb l'estructura distorsionada, els estudis amb l'inhibidor s'han d'interpretar com les interaccions que exerceix la 1,3-1,4- β -glucanasa amb el producte de reacció. A més, sembla que el posicionament fi del lligand en el centre actiu de l'enzim difereix una mica entre el substrat i el producte, i que en aquest posicionament la presència de l'aglicona juga un paper important. En el complex amb el producte de reacció sembla que tot el sucre està una mica desplaçat cap a l'extrem no-reductor, mentre que la presència de l'aglicona sembla ancorar millor el substrat per la banda reductora posicionant-lo per a la hidròlisi. Aquest desplaçament cap a l'extrem no reductor del producte de reacció respecte del substrat s'ha vist en altres complexos glicosidasa-lligand [76, 383] donant a entendre que no hi ha cap raó perquè les interaccions que es veuen amb el producte de reacció siguin exactament les mateixes que s'estableixen amb el substrat. Per tant els arguments que justifiquen que les interaccions observades en fer servir com a lligand el G4G3G siguin diferents de les observades amb els substrats són tres: l'existència/absència d'interaccions en els subsetis positius de l'enzim, la diferent conformació de la piranososa

que ocupa el subseti -1, i el desplaçament en el posicionament del producte de reacció respecte del del substrat.

Així doncs, el conjunt de resultats cinètics obtinguts permeten avaluar la influència de la tirosina 152 en tres moments diferents de la reacció (taules 4.13 i 4.14). Els valors de les K_M i k_{cat}/K_M obtingudes en les cinètiques amb β -glucà i amb el substrat G4G3G-MU donen informació sobre la influència d'aquest residu en el complex de Michaelis i en l'estat de transició, respectivament. I les K_I obtingudes en presència de G4G3G aporten informació sobre el complex enzim-producte. És possible que les interaccions amb l'inhibidor també aportin informació sobre l'intermedi de reacció, ja que si la 1,3-1,4- β -glucanasa es comporta com altres glicosidases en les que el substrat adopta una conformació 1S_3 en el complex de Michaelis, la conformació en l'intermedi seria de 4C_1 . Tot i així, com a l'intermedi la glucopiranososa que ocupa el subseti -1 es troba unida covalentment al nucleòfil, segurament es troba desplaçada cap a les posicions de l'extrem reductor respecte de l'estructura del complex enzim-producte.

L'avaluació de la interacció directa de la tirosina 152 amb el lligand s'estudia a través dels resultats obtinguts fent servir el mutant Y152F, en què s'elimina el grup hidroxil de la tirosina. Els resultats indiquen que els efectes són pràcticament nuls en la unió del producte de reacció i del substrat, en el cas de fer servir el β -glucà d'ordi, mentre que la unió del substrat millora substancialment en presència de G4G3G-MU. Aquests resultats són coherents amb l'estructura del complex amb el producte de reacció, en què no s'observa una interacció directa de la Tyr152 amb el lligand, i deixen clar que l'estructura del complex enzim-hexasacàrid, en base a la qual s'esperaria un augment de K_M per pèrdua d'interacció per pont d'hidrogen entre l'hidroxil a C2 i C3 de les glucopiranososes que ocupen els subsetis -1 i +1, respectivament, i l'hidroxil de la tirosina 152, no és representativa del complex de Michaelis. Pel que fa a la diferent afinitat per substrat que presenta el mutant Y152F envers el β -glucà i el G4G3G-MU, ja s'ha comentat amb anterioritat que l'augment en el caràcter hidrofòbic de l'aglicona en aquest darrer substrat comporta una interacció d'apilament hidrofòbic més forta amb la fenilalanina 152. Aquesta diferent interacció que es dona amb la 4-metilumbel·liferona pot ser la causant de la disminució en K_M , directament, i/o indirectament, ja que pot comportar una major distorsió de la piranososa que ocupa el subseti -1 optimitzant les interaccions amb diferents residus del centre actiu, que no pas en el cas que el centre actiu estigui ocupat només per unitats de piranososa.

Pel que fa a l'estat de transició l'eliminació de l'hidroxil de la tirosina 152 provoca una lleugera desestabilització quan es treballa amb β -glucà (0.4 kcal·mol⁻¹) i una estabilització quan es treballa amb el G4G3G-MU (-0.48 kcal·mol⁻¹). Aquesta estabilització molt possiblement és una conseqüència directa de la millora en la unió del complex de Michaelis, potser a través d'una estructura distorsionada més semblant a la que adopta l'estat de transició. En la reacció amb el β -glucà, és possible que en eliminar el grup hidroxil es perdi alguna interacció amb la unitat de glucopiranososa que ocupa el subseti +1, que és on es troba situat aquest residu. No és probable que es perdi una interacció indirecta en un altre subseti, ja que a les estructures dels diferents complexos resolts, no s'observa que l'hidroxil de la tirosina estigui formant part d'una xarxa de ponts d'hidrogen amb altres residus.

Taula 4.13. Paràmetres cinètics que fan referència a la unió del lligand a l'enzim salvatge i als mutants Y152A i Y152F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, en diferents moments de la reacció. Els paràmetres k_{cat} i k_{cat}/K_M són els obtinguts en la reacció dels enzims amb el β -glucà d'ordi i el G4G3G-MU, mentre que el paràmetre K_I s'ha obtingut a partir dels estudis d'inhibició amb el trisacàrid G4G3G en les cinètiques amb el substrat sintètic G4G3G-MU a pH 7.2.

Enzim	Substrat: β -glucà d'ordi		K_I / mM	Substrat: G4G3G-MU	
	K_M / mg·mL ⁻¹	(k_{cat}/K_M) / mL·(s·mg) ⁻¹		K_M / mM	(k_{cat}/K_M) / mM ⁻¹ ·s ⁻¹
wt	0.5 ± 0.1	1800 ± 500	2.7 ± 0.4	0.92 ± 0.03	0.68 ± 0.03
Y152F	0.47 ± 0.04	1000 ± 100	2.86 ± 0.08	0.18 ± 0.01	1.5 ± 0.1
Y152A	0.39 ± 0.03	150 ± 10	0.125 ± 0.003	1.03 ± 0.03	0.054 ± 0.002

Taula 4.14. Valors de $\Delta\Delta G$ associats als paràmetres cinètics de la taula 4.13, prenent com a referència els resultats de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Enzim	Substrat: β -glucà d'ordi		$\Delta\Delta G_{unió}$ producte / kcal·mol ⁻¹	Substrat: G4G3G-MU	
	$\Delta\Delta G_{unió}$ substrat / kcal·mol ⁻¹	$\Delta\Delta G^\ddagger$ / kcal·mol ⁻¹		$\Delta\Delta G_{unió}$ substrat / kcal·mol ⁻¹	$\Delta\Delta G^\ddagger$ / kcal·mol ⁻¹
wt	-	-	-	-	-
Y152F	-0.1 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1	-0.98 ± 0.05	-0.48 ± 0.07
Y152A	-0.2 ± 0.2	1.5 ± 0.2	-1.8 ± 0.1	0.07 ± 0.04	1.52 ± 0.05

L'eliminació de tot el grup fenol de l'estructura del residu 152, que s'avalua en el mutant Y152A, comporta canvis més significatius. Si bé no afecta gaire la unió de cap dels dos substrats, desestabilitza l'estat de transició amb una $\Delta\Delta G^\ddagger$ de 1.5 kcal·mol⁻¹, i estabilitza la unió del producte de reacció en 1.8 kcal·mol⁻¹. Encara que sembli que aquests dos efectes vagin en sentit contrari, en els dos casos la mutació implica una disminució de l'eficiència catalítica de la 1,3-1,4- β -glucanasa; en un dels casos, per desestabilització directa de l'estat de transició de la glicosidació; i en l'altre cas, perquè una millor unió del producte és sinònim d'una pitjor dissociació, de manera que el mutant ha d'invertir més energia, que no pas l'enzim salvatge, en l'alliberament del producte de reacció abans d'iniciar el nou cicle catalític.

En aquest cas, sembla que l'eliminació del grup fenil de la tirosina 152 afebleix, directa o indirectament, alguna interacció que no és important en el complex de Michaelis, però que passa a ser-ho en l'estat de transició, i que és més important en el cas del mutant Y152A ($\Delta\Delta G^\ddagger$ de 1.5 kcal·mol⁻¹) que no en el cas del mutant Y152F ($\Delta\Delta G^\ddagger$ de 0.4 kcal·mol⁻¹). Aquesta interacció pot tractar-se del pont d'hidrogen entre l'oxigen carbonílic del nucleòfil i l'hidroxil a C2 de la unitat de glucopiranososa del subseti -1. En eliminar el grup fenil deixa d'establir-se la interacció d'apilament hidrofòbic amb el triptòfan 132, i és possible que es tradueixi en una variació en la posició del nucleòfil respecte del substrat, que en definitiva sigui la causant de la disminució de l'eficiència catalítica de l'enzim de 12 vegades respecte de l'enzim salvatge. En aquesta disminució d'activitat segurament juguen un paper important tant la posició del Glu134 per tal d'actuar com a nucleòfil, com la seva possible interacció amb l'hidroxil a C2.

D'altra banda, a partir de la dependència de la K_1 amb la temperatura del mutant Y152A es determina que la millora en la unió del producte per part del mutant respecte de l'enzim salvatge comporta una $\Delta\Delta H$ de $-2.7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Donat que el paràmetre K_1 avalua solament la unió, independentment de l'activitat enzimàtica, es proposa que el principal efecte de la mutació Y152A en la unió del producte de reacció, és una millora de la interacció per pont d'hidrogen que es dona entre el nucleòfil i el glicòsid. Segurament, aquesta interacció també es dona en l'enzim salvatge, i en el mutant Y152A només es produeix una millora en la geometria o distància interatòmica del pont d'hidrogen.

Respecte de la conformació adoptada pel lligand al centre actiu, sembla que el mutant Y152A estabilitzi preferentment la unió de la conformació de cadira relaxada amb una $\Delta\Delta G_{\text{unió}}$ de $-1.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, mentre que el mutant Y152F, en el que pren rellevància la interacció hidrofòbica en el subseti +1, s'afavoreix la unió d'una unitat de piranosa distorsionada amb una $\Delta\Delta G_{\text{unió}}$ de $-0.98 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ respecte de l'enzim salvatge en el cas de substrats amb aglicones aromàtiques.

4.7. Avaluació de la interacció que s'exerceix amb l'hidroxil a C2 a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* per modificació del substrat

Una altra manera d'estudiar la interacció que s'estableix amb l'hidroxil a C2 es basa en determinar els canvis que es produeixen en eliminar aquest hidroxil de l'estructura del substrat. En aquesta aproximació no es produeixen variacions en l'estructura del centre actiu i es pot avaluar la importància d'aquesta interacció directament en l'enzim salvatge. Si bé no es disposa de l'estructura cristal·logràfica d'un complex β -glucanasa-substrat, el modelatge molecular del complex amb el substrat G4G4G3G-MU [150] i els resultats obtinguts amb els mutants de la tirosina 152 indiquen que l'únic residu que estaria fent pont d'hidrogen amb l'hidroxil a C2 és el residu que fa de nucleòfil, i per tant, els canvis que es produeixin com a resultat de l'eliminació de l'hidroxil a C2 estan directament associats a la pèrdua d'aquesta interacció. Les cinètiques de la 1,3-1,4- β -glucanasa es duen a terme amb els substrats G4G4G3G-4NP i G4G4G3(2dG)-4NP, que només difereixen per la substitució per un àtom d'hidrogen del grup hidroxil que ocupa la posició C2 en la unitat de glucopiranososa que sustenta l'enllaç a escindir. S'inclouen també en l'estudi els dos mutants en la posició 152, per tal d'aprofundir en l'efecte exercit per aquest residu. Tot i que la hidròlisi espontània dels 2-desoxiglicòsids és superior a la dels glicòsids anàlegs, i en concret per al G4G4G3(2dG)-4NP la velocitat d'hidròlisi espontània determinada és de $v = 3.78 \cdot 10^{-8} \cdot [S]$ en $\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ a les condicions emprades en els experiments, s'ha treballat a unes concentracions d'enzim suficientment elevades com perquè la hidròlisi espontània del substrat es pugui considerar menyspreable. A la figura 4.26 es presenten els resultats de les cinètiques dels tres enzims amb els dos substrats diferents, i es mostra l'ajust del model de Michaelis-Menten amb o sense inhibició acompetitiva per substrat als resultats obtinguts.

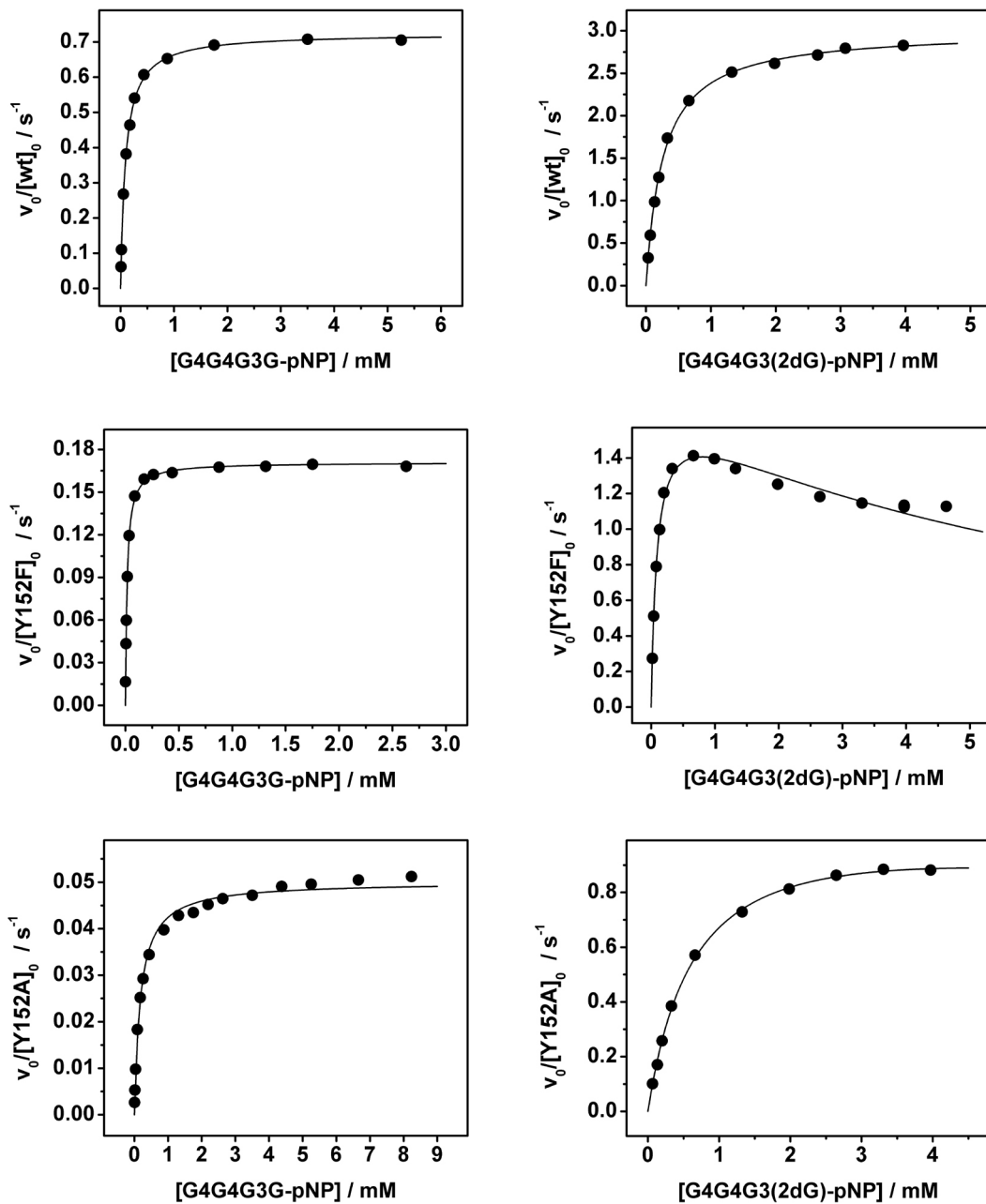


Figura 4.26. Cinètiques de l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb els substrats G4G4G3G-4NP i G4G4G3(2dG)-4NP, en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM $CaCl_2$, pH 7.2, a 30 °C. En el gràfic es representa la $v_0/[E]_0$ respecte de la $[S]$. En cada gràfic es mostra l'ajust del model de Michaelis-Menten amb o sense inhibició acompetitiva per substrat, als resultats obtinguts.

Taules 4.15. i 4.16. Paràmetres cinètics obtinguts en les cinètiques de l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb els substrats G4G4G3G-4NP i G4G4G3(2dG)-4NP en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.2, a 30 °C. A la taula 4.16 s'inclou la $\Delta\Delta G_{\text{unió}}$ que avalua la importància de la interacció amb l'hidroxil a C2 en la formació del complex de Michaelis. $\Delta\Delta G_{\text{unió}} = -R \cdot T \cdot \ln(1/(K_{M, 2\text{-desoxianàleg}}/K_{M, \text{substrat completament hidroxilat}}))$

Enzim	Substrat: G4G4G3G-4NP		Substrat: G4G4G3(2dG)-4NP	
	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$(k_{\text{cat}}/K_M) / \text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$(k_{\text{cat}}/K_M) / \text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$
wt	0.726 ± 0.003	7.7 ± 0.2	3.01 ± 0.02	11.5 ± 0.3
Y152F	0.1709 ± 0.0005	11.0 ± 0.2	1.70 ± 0.05	19 ± 2
Y152A	0.0434 ± 0.0005	0.23 ± 0.01	1.15 ± 0.04	1.69 ± 0.09

Enzim	$K_M(\text{G4G4G3G-4NP}) / \text{mM}$	$K_M(\text{G4G4G3(2dG)-4NP}) / \text{mM}$	$\Delta\Delta G_{\text{unió}} / \text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$
wt	0.094 ± 0.002	0.261 ± 0.006	0.62 ± 0.03
Y152F	0.0155 ± 0.0003	0.088 ± 0.008	1.05 ± 0.07
Y152A	0.186 ± 0.009	0.68 ± 0.04	0.78 ± 0.06

Per a l'enzim salvatge l'eliminació de l'hidroxil a C2 implica un augment de K_M , que es concreta en una $\Delta\Delta G_{\text{unió}}$ per a la formació del complex de Michaelis de $0.62 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Aquesta millora de la unió del substrat completament hidroxilat respecte del 2-desoxianàleg és bastant inferior a l'energia associada a un pont d'hidrogen amb un acceptor carregat, tot i així, s'ha observat concurrentment en β -glicosidases que la interacció a C2 no és gaire important en el complex de Michaelis i que s'optimitza en l'estat de transició. Hi ha diferents explicacions possibles per a aquest valor en el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa:

- El pont d'hidrogen que s'estableix entre l'hidroxil a C2 i el nucleòfil no és una interacció que estigui optimitzada en l'estat fonamental, ni a nivell d'orientació ni de distància. En aquest sentit és possible que el posicionament del nucleòfil vingui més marcat pel seu paper en catàlisi, que no pas per aquesta interacció, que estableix addicionalment. A més, és bo recordar que la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* és una endosacaridasa amb un centre actiu estès, on no cal que la interacció entre el nucleòfil i l'hidroxil a C2 prengui un paper rellevant, ja que hi ha diversos subsetis que poden jugar un paper en l'estabilització del complex de Michaelis.

- Una altra opció és que en el cas del desoxianàleg **68** la K_M no sigui representativa del complex de dissociació enzim-substrat. Aquesta possibilitat només es planteja en el cas del desoxiglicòsid, ja que se sap que en el cas dels substrats completament hidroxilats la glicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció (veure el capítol 6). L'eliminació de l'hidroxil a C2 estabilitza electrostàticament els estats de transició tant de l'etapa de glicosidació com de la de desglicosidació, i potser en el cas del desoxianàleg la desglicosidació passi a ser limitant de la velocitat de reacció. D'altra banda, en diversos casos s'ha demostrat que l'efecte de la deshidroxilació a C2, per pèrdua d'una interacció important amb l'enzim, afecta més severament l'etapa de desglicosidació que no pas la de glicosidació [144, 309, 310], arribant inclús a fer que aquesta passi a ser determinant de la velocitat de reacció amb substrats en què la glicosidació és l'etapa determinant de la velocitat de reacció per a l'anàleg completament hidroxilat [309, 310]. Com ja s'ha explicat en comparar les K_M dels

mutants de la tirosina 152, una desglicosidació limitant comporta una disminució de la K_M que no té res a veure amb la dissociació del complex enzim-substrat. En aquest cas, com la K_d del 2-desoxiglicòsid **68** seria superior a la K_M , en comparar les K_M s'estaria infravalorant la força de la interacció amb l'hidroxil a C2. Aquesta possibilitat podria abordar-se realitzant una anàlisi de Hammett de la 1,3-1,4- β -glucanasa amb una família de 2-desoxiglicòsids.

- Finalment, i en base a uns resultats de modelatge molecular realitzats recentment, cal considerar que la conformació que adoptin els dos substrats al centre actiu de l'enzim no sigui la mateixa. En modelar un substrat completament hidroxilat al centre actiu de la β -glucanasa s'ha comprovat que la conformació adoptada per la unitat de piranosa que ocupa el subseti -1 és una conformació distorsionada de 1S_3 , mentre que la conformació adoptada en el mateix subseti per a una 2-desoxiglucopiranosa, en fer servir per al modelatge el substrat G4G4G3(2dG)-MU, és de 1S_5 (figura 4.27) [384]. Acceptant que aquestes siguin les conformacions adoptades en els complexos de Michaelis respectivament, els resultats de les cinètiques no es poden avaluar només en base a la pèrdua d'una interacció per pont d'hidrogen, ja que, d'una banda, les interaccions que s'estableixen en el subseti -1 amb les dues conformacions, i les que com a conseqüència es donin en els subsetis adjacents, poden ser diferents; i d'altra banda, el camí conformacional seguit pels dos substrats al llarg de la reacció també podria ser diferent.

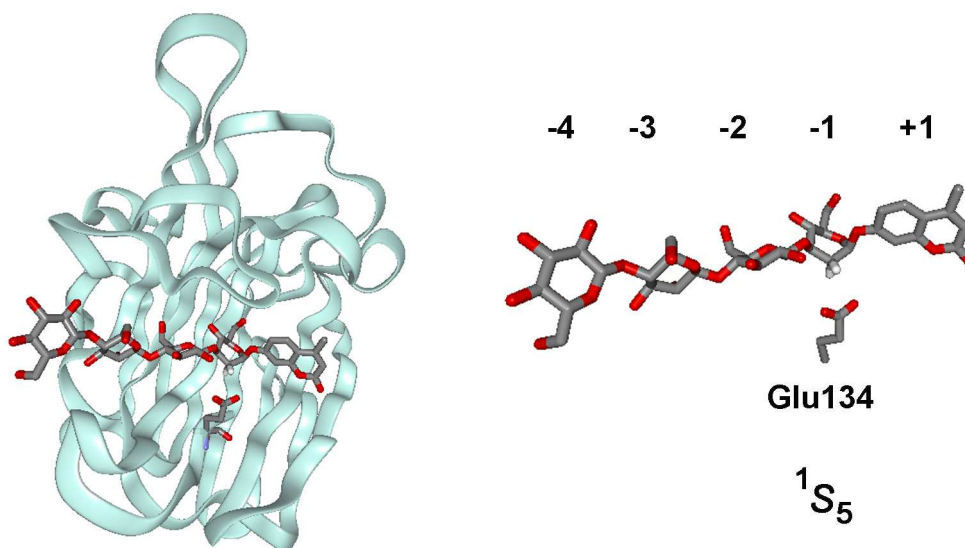


Figura 4.27. Estructura del modelatge molecular d'un complex de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G4G3(2dG)-MU [384]. En aquest modelatge la unitat de piranosa que ocupa el subseti -1 adopta una conformació de nau torçada 1S_5 , i el glutamat 134 adopta una conformació clarament diferent de l'adoptada en el modelatge amb el substrat completament hidroxilat.

El resultat més sorprenent no és l'efecte que té l'eliminació de l'hidroxil en la unió del substrat, sinó el seu efecte en catàlisi (taules 4.15 i 4.17). Amb tots els antecedents bibliogràfics amb els s'ha arribat a postular de forma genèrica, que a les β -glicosidases que actuen amb retenció de configuració, la interacció amb l'hidroxil a C2 aporta la major part de l'energia requerida per a la catàlisi enzimàtica, el que sobta és que a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* la catàlisi millori en absència d'aquest hidroxil, amb una k_{cat} 4 vegades superior per a la hidròlisi del 2-desoxi anàleg. La $\Delta\Delta G^\ddagger$

associada a l'eliminació de l'hidroxil, lluny de les 5-10 kcal·mol⁻¹ descrita per a altres β -glicosidases, és de -0.24 kcal·mol⁻¹.

Taula 4.17. $\Delta\Delta G^\ddagger$ associada a la substitució per un àtom d'hidrogen de l'hidroxil a C2 de la unitat de glucopiranososa que ocupa el subseti -1, per a l'enzim salvatge i els mutants Y152F i Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Cinètiques realitzades amb els substrats G4G4G3G-4NP i G4G4G3(2dG)-4NP en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.2, a 30 °C. $\Delta\Delta G^\ddagger = -R \cdot T \cdot \ln ((k_{\text{cat}}/K_{\text{M}, 2\text{-desoxianàleg}})/(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}, \text{substrat completament hidroxilat}}))$.

Enzim	$\Delta\Delta G^\ddagger / \text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
wt	-0.24 ± 0.03
Y152F	-0.33 ± 0.07
Y152A	-1.20 ± 0.06

Aquests resultats s'han d'interpretar estant oberts a dues possibilitats diferents. L'una, que en absència d'aquest hidroxil el mecanisme seguit sigui bàsicament el mateix que en els substrats completament hidroxilats (mateixa estructura de l'estat de transició); i l'altre, que la conformació de l'estat de transició sigui diferent en els dos casos, com podrien indicar els estudis recents de modelatge molecular [384]. En el primer dels casos els resultats indiquen que a la 1,3-1,4- β -glucanasa aquesta interacció no és gaire important, i que el pes de l'efecte electrostàtic de la substitució del grup hidroxil a C2 per un àtom d'hidrogen en l'estabilització de l'estat de transició, que en la hidròlisi espontània de glicòsids s'ha postulat que és d'aproximadament 3.1 kcal·mol⁻¹ [326], és superior a l'efecte de la interacció a C2. Així doncs, sembla que a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* el glutamat 134 no juga el paper dual que exerceix el nucleòfil en d'altres β -glicosidases que actuen amb retenció de configuració, prioritzant en gran mesura el seu paper de residu essencial en catàlisi, sobre el paper de principal estabilitzador de l'estructura de l'estat de transició. En el segon dels casos, si es parteix d'un complex de Michaelis amb una conformació diferent i es passa a través d'un estat de transició amb una conformació també diferent, els resultats obtinguts amb aquest tipus d'experiment no són els idonis per tal d'avaluar la importància de la interacció amb l'hidroxil a C2. Tot i així, el fet que la pèrdua d'un únic hidroxil provoqui un canvi de mecanisme estaria indicant que es tracta d'una interacció clau en el mecanisme de l'enzim salvatge. Aquesta ambigüitat es podria resoldre si es disposés de les estructures cristal·logràfiques de la 1,3-1,4- β -glucanasa en complex de Michaelis amb cadascun dels dos substrats, per tal de comprovar si les estructures observades en els modelatges són les estructures que es donen realment, i de les estructures dels complexos dels intermedis de reacció, de manera que es pugui fer una predicció de quina és la conformació adoptada per l'estat de transició en cada cas.

Per als mutants de la tirosina 152, l'efecte de la deshidroxilació segueix el mateix sentit que en el cas de l'enzim salvatge. És a dir, la unió del substrat empitjora degut a la deshidroxilació, però la k_{cat} millora; com l'efecte en k_{cat} supera l'efecte en K_{M} , en tots els casos millora l'eficiència catalítica de l'enzim. En la formació del complex de Michaelis es continua observant el fet que la unió d'oligosacàrids amb aglicones aromàtiques en el centre actiu del mutant Y152F està afavorida, tot i que en el cas del 2-desoxianàleg aquesta millora no és tant important (taules 4.16 i 4.18). De fet, aquest és el mutant en el que es nota més l'efecte de la deshidroxilació en la formació del complex de Michaelis amb una $\Delta\Delta G$ de 1.05 kcal·mol⁻¹. Ja s'ha proposat amb

anterioritat que la millora en la unió que es dona en aquest mutant podria estar causada per la unió d'una conformació més semblant a la de l'estat de transició en què s'optimitzen les interaccions enzim-substrat. Si realment l'anàleg 2-desoxi s'uneix a l'enzim amb una conformació diferent a la del substrat completament hidroxilat, tindria sentit que aquest sigui el mutant en el que es fa més palès aquest canvi de conformació.

Taula 4.18. Valors de $\Delta\Delta G$ associats a l'etapa d'unió de substrat ($\Delta\Delta G_{\text{unió}}$) i a l'estat de transició ($\Delta\Delta G^{\ddagger}$) per a la hidròlisi dels substrats G4G4G3G-4NP i G4G4G3(2dG)-4NP amb els mutants Y152F i Y152A, prenent com a referència els resultats de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Cinètiques realitzades en tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.2, a 30 °C. $\Delta\Delta G^{\ddagger} = -R \cdot T \cdot \ln [(k_{\text{cat}}/K_{\text{M, mut}})/(k_{\text{cat}}/K_{\text{M, wt}})]$. $\Delta\Delta G_{\text{unió}} = -R \cdot T \cdot \ln [1/(K_{\text{M, mut}}/K_{\text{M, wt}})]$.

	Substrat: G4G4G3G-4NP		Substrat: G4G4G3(2dG)-4NP	
Enzim	$\Delta\Delta G_{\text{unió}} / \text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta\Delta G^{\ddagger} / \text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta\Delta G_{\text{unió}} / \text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta\Delta G^{\ddagger} / \text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$
wt	----	----	----	----
Y152F	-1.09 ± 0.02	-0.21 ± 0.03	-0.65 ± 0.07	-0.30 ± 0.08
Y152A	0.41 ± 0.04	2.11 ± 0.04	0.58 ± 0.05	1.16 ± 0.05

El fet que l'estabilització de l'estat de transició induïda per l'eliminació del grup hidroxil a C2 sigui més important en el cas dels dos mutants, que no pas per a l'enzim salvatge, amb un efecte especialment important en el mutant Y152A (taula 4.17), indiquen, d'una banda, que no es tracta només d'un efecte causat per la diferència d'electronegativitat entre els substituents a C2, ja que en aquest cas els resultats serien similars, i d'altra banda, que encara que aquesta tirosina no estigui interaccionant directament amb l'hidroxil a C2, la seva mutació comporta un canvi significatiu en l'entorn del residu que interacciona amb aquest hidroxil, el nucleòfil. Només en el cas que no hi hagi canvi de mecanisme com a conseqüència de l'eliminació de l'hidroxil, la $\Delta\Delta G^{\ddagger}$ associada a aquesta deshidroxilació permetria avaluar directament la importància de la interacció per pont d'hidrogen amb el nucleòfil entre els tres enzims, considerant que la contribució electrònica associada a l'eliminació de l'hidroxil a C2 és similar per als tres enzims. En aquest supòsit, es comprovaria que aquesta interacció es va enfortir per efecte de les mutacions amb $\Delta\Delta G^{\ddagger}$ associades de -0.24 , -0.33 i $-1.20 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, per a l'enzim salvatge, el mutant Y152F i el mutant Y152A, respectivament.

Per als dos substrats, la mutació Y152A comporta una pèrdua d'eficiència catalítica molt important, amb una $\Delta\Delta G^{\ddagger}$ de $2.11 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ per al G4G4G3G-4NP, i de $1.16 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ per al seu 2-desoxianàleg (taula 4.18). Aquesta darrera $\Delta\Delta G^{\ddagger}$ permet avaluar directament la importància del correcte posicionament del nucleòfil, ja que en fer servir com a substrat el 2-desoxiglicòsid **68** s'elimina per complet la influència en els resultats del pont d'hidrogen a C2. Així doncs, aquesta desestabilització de $1.16 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ per al mutant Y152A (taula 4.18) és conseqüència directa del posicionament incorrecte del nucleòfil per a la catàlisi. Conseqüentment, si no es dona canvi de mecanisme en funció del substrat, l'empitjorament de la catàlisi en el mutant Y152A fent servir com a substrat el G4G4G3G-4NP estaria causat principalment per dos efectes additius, la pèrdua d'interaccions del nucleòfil amb altres residus del centre actiu que ajuden al seu correcte posicionament, i l'enfortiment d'una interacció amb l'hidroxil a C2 que dificulta el seu paper en la catàlisi.

4.8. Conclusions

- A la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* el Glu134 és l'únic residu que interacciona amb l'hidroxil a C2 de la unitat de piranosa que ocupa el subseti -1 en el complex enzim-substrat.
- El trisacàrid G4G3G mostra un comportament diferent en funció del pH en les cinètiques d'hidròlisi del substrat G4G3G-MU amb l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, que porta a postular un mecanisme en què es donen conjuntament els fenòmens d'inhibició competitiva i activació no essencial. La importància relativa dels dos comportaments depèn del pH de treball, veient-se afavorida la inhibició competitiva a pH 5 i superiors i l'activació no essencial a pH 3. A pH 4 s'observa un comportament mixt que depèn de la concentració de substrat.
- Donat que amb els tres enzims estudiats (wt, Y152F i Y152A) la hidròlisi del 2-desoxiglicòsid **68** és més ràpida que la del seu anàleg completament hidroxilat **24**, s'arriba a la conclusió que, si la reacció d'hidròlisi del compost **68** segueix el mateix mecanisme que la dels substrats completament hidroxilats, la interacció per pont d'hidrogen entre l'hidroxil a C2 del substrat i el nucleòfil no és una interacció important.
- El mutant Y152F estabilitza especialment la unió de substrats amb aglicones aromàtiques de manera que aquesta estabilització es fa notar també en l'estat de transició. Es proposa que aquest mutant uneix aquests substrats en una conformació distorsionada més propera a la conformació de l'estat de transició que no pas l'enzim salvatge.
- La mutació Y152A comporta el trencament d'una xarxa d'interaccions que posiciona el Glu134 per a la catàlisi, i provoca un enfortiment de la interacció per pont d'hidrogen entre el nucleòfil i l'hidroxil a C2 del substrat. Com a conseqüència la velocitat d'hidròlisi dels substrats disminueix de forma significativa.
- La conclusió conjunta dels resultats d'unió per avaluació dels paràmetres K_M i K_I semblen indicar que el mutant Y152A presenta major afinitat per un lligand amb una conformació de cadira 4C_1 que no amb una conformació distorsionada 1S_3 .

4.9. Consideracions mecanístiques addicionals. Segona branca en el mecanisme catalític

Com a apunt final del capítol es vol remarcar un fet que lliga amb els resultats obtinguts en altres capítols de la present tesi. Per a la majoria de les cinètiques realitzades en l'estudi del paper que juga la interacció amb l'hidroxil a C2, el model de Michaelis-Menten amb o sense inhibició acompetitiva per substrat, s'ajusta bé a les dades. Tanmateix hi ha una sèrie de cinètiques realitzades amb el mutant Y152F i una altra amb el mutant Y152A que, a concentracions de substrat elevades, no es descriuen prou correctament amb aquests models. A la figura 4.28 es mostren les cinètiques del mutant Y152F amb els substrats G4G3G-MU (en què s'han fet servir concentracions de substrat exageradament elevades per tal de reflectir millor l'efecte), G4G4G3G-MU i

G4G4G3(2dG)-4NP, i la cinètica del mutant Y152A amb el substrat G4G4G3G-4NP. El model amb inhibició acompetitiva prediu que a concentracions elevades d'inhibidor la velocitat de reacció tendeix a 0. Com a la 1,3-1,4- β -glucanasa, el mateix substrat fa també d'inhibidor acompetitiu, a concentracions molt elevades de substrat la velocitat de reacció hauria de tendir a 0. Tot i que en les cinètiques realitzades no s'arriba a concentracions de substrat prou elevades, el que sí que es pot veure és que la velocitat no tendeix a 0, sinó que a les cinètiques amb el mutant Y152F es tendeix a un valor inferior a V_{\max} però diferent de 0; mentre que amb el mutant Y152A la velocitat, a concentracions elevades de substrat, supera la V_{\max} de l'ajust del model de Michaelis-Menten (en aquest darrer cas i amb la finalitat que l'efecte es vegi millor, el model de Michaelis-Menten s'ha ajustat prenent només els resultats a $[S] < 2$ mM). Aquestes cinètiques s'han repetit, en alguns casos també canviant la $[E]$, i en tots els casos, les tendències són les que es mostren en els gràfics.

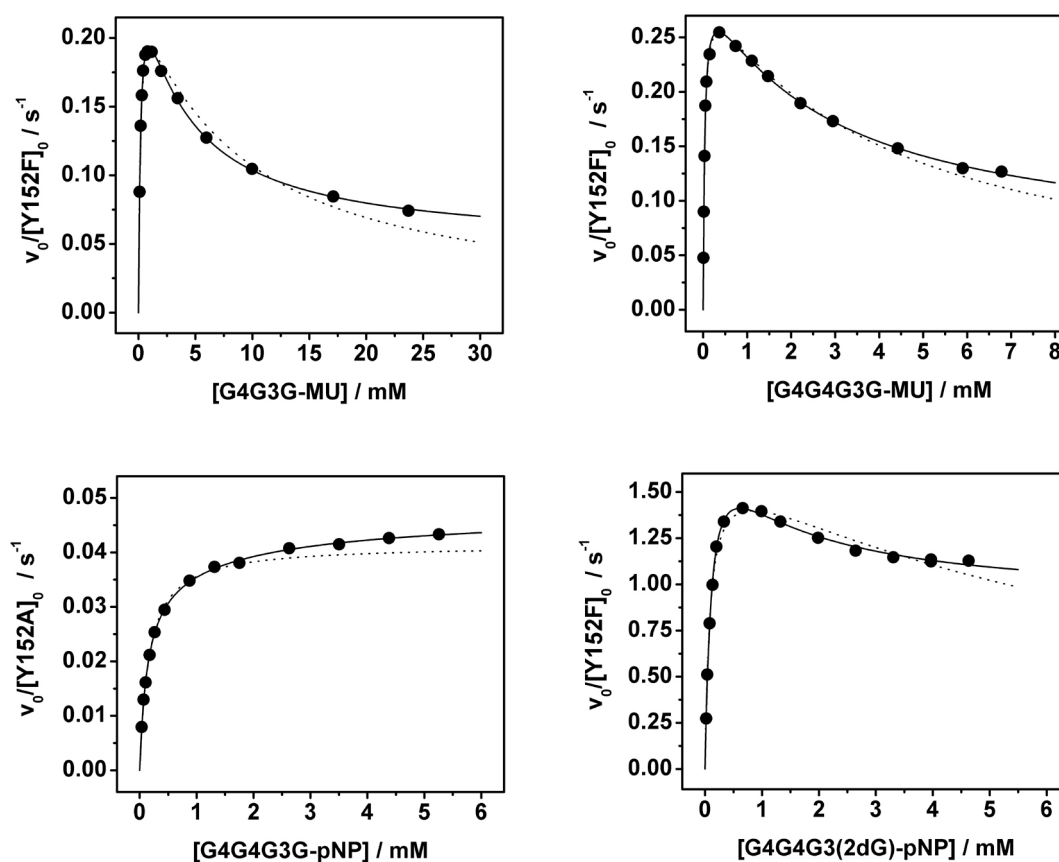
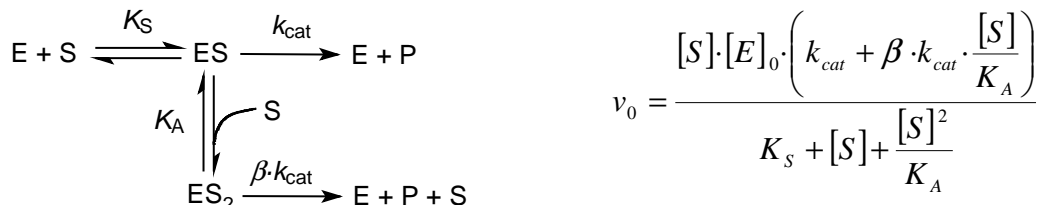


Figura 4.28. Cinètiques de reacció del mutant Y152F de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb els substrats G4G3G-MU (a dalt, esquerra), G4G4G3G-MU (a dalt, dreta), G4G4G3(2dG)-4NP (a baix, dreta) i del mutant Y152A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb G4G4G3G-4NP (a baix, esquerra). Condicions experimentals: tampó 6.5 mM citrat, 87 mM fosfat, 0.1 mM CaCl_2 , pH 7.2, a 30 °C. En les gràfiques es representa la $v_0/[E]_0$ respecte de la $[S]$, s'ajusten dos models diferents als resultats obtinguts, en línia contínua es presenta l'ajust del model de dues branques (figura 4.29), i en línia puntejada l'ajust del model de Michaelis-Menten amb inhibició acompetitiva en el cas del mutant Y152F, i del model de Michaelis-Menten en el cas del mutant Y152A.

A la figura 4.28 la línia puntejada correspon a l'ajust del model de Michaelis-Menten amb o sense inhibició acompetitiva per substrat, mentre que la línia contínua mostra l'ajust del model amb dues branques que es mostra a la figura 4.29, en què hi ha dues espècies actives, tant el complex binari ES, com el complex ternari amb una segona molècula de substrat, que descriu millor els resultats obtinguts.



Equació 4.8.

Figura 4.29. Model amb dues branques, en què hi ha dues espècies actives, el complex binari ES i un complex ternari amb dues molècules de substrat, ES₂. L'equació 4.8 és l'equació de velocitat associada al model.

El fet que la velocitat final estigui per sobre o per sota de la V_{max} no implica dos mecanismes diferents, sinó una combinació de constants diferent, de manera que no és d'estranyar que un mecanisme únic sigui capaç d'explicar els diferents comportaments observats, inclòs el comportament michaelià, amb o sense inhibició acompetitiva. En els estudis d'inhibició per producte a diferents pH de la 1,3-1,4-β-glucanasa també s'ha fet palesa la presència d'una segona branca, que comporta la formació d'un compost ternari amb activitat enzimàtica. I les cinètiques de l'enzim salvatge amb el β-glucà d'ordi, que és un dels seus substrats naturals, també reflecteix un ajust millor en el cas d'un mecanisme ramificat, que no en el cas del mecanisme bàsic de retenció de configuració (a la figura 4.30 la línia contínua mostra l'ajust del mecanisme ramificat que es mostra a la figura 4.29, mentre que la línia puntejada mostra l'ajust del model bàsic de retenció de configuració).

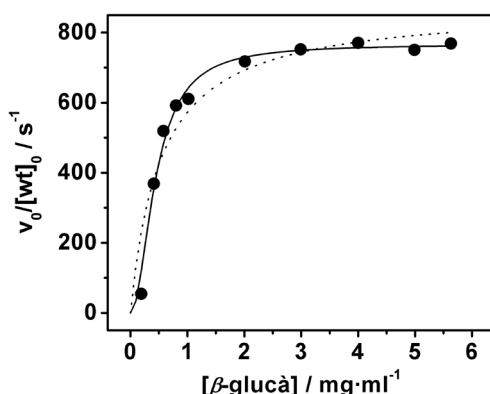


Figura 4.30. Cinètica d'hidròlisi del β-glucà d'ordi en presència de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Condicions de reacció: tampó fosfat 30 mM, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.2 i 30 °C. A la gràfica en què es representa la v₀/[wt]₀ enfront de la concentració de substrat. En línia contínua es mostra l'ajust del model ramificat que es mostra a la figura 4.29, i en línia discontinuada es presenta l'ajust del mecanisme bàsic de retenció de configuració en dues etapes, als resultats obtinguts.

Totes aquestes evidències, permeten suggerir que l'activitat enzimàtica de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* es descriu millor amb un mecanisme amb dues branques actives, com el mecanisme de la figura 4.29, en què la primera branca del model, definida per les constants k_{cat} i K_S , correspon al mecanisme general d'hidròlisi enzimàtica de glicòsids en dues etapes; que no amb un model de retenció de configuració bàsic en dues etapes.

El desenvolupament formal d'aquest mecanisme es realitza en els següents capítols relacionats amb estudis en estat preestacionari i anàlisi de Hammett de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Capítol 5. Estudis mecànics mitjançant cinètiques enzimàtiques en estat preestacionari

5.1. Cinètiques enzimàtiques en estat preestacionari

Les cinètiques enzimàtiques en estat estacionari permeten establir l'especificitat per substrat de l'enzim en estudi i obtenir informació general sobre les condicions de catàlisi, així com la seva dependència enfront de diferents condicions externes al sistema [347, 385], però generalment no aporten informació detallada del mecanisme de reacció. Per tal d'obtenir informació mecànica s'han de dissenyar experiments específics (anàlisis de Hammett, efectes isotòpics) o bé realitzar les cinètiques en estat preestacionari. Les cinètiques en estat preestacionari permeten, en el millor dels casos, detectar els diferents intermedis enzim-lligand generats durant un cicle catalític i determinar les constants de velocitat individuals de les diferents etapes [347, 386, 387].

La principal característica de les cinètiques en estat preestacionari és el marge de temps estudiat, que va des dels pocs mil·lisegons als pocs minuts. Amb aquest propòsit en els estudis en estat preestacionari es fan servir tècniques de barreja enzim-substrat ràpides, com són les tècniques de flux interromput (de l'anglès *stopped-flow*) [388, 389] o tècniques d'aturada ràpida (de l'anglès *quench-flow*); en què la velocitat màxima mesurable està limitada pel temps que s'empra en barrejar els reactius i transportar-los des de la cambra de barreja fins a la cel·la de detecció. Aquest lapse de temps, anomenat temps mort de l'aparell, generalment dura entre 1 i 2 ms. Això permet fixar un límit superior de mesura de la velocitat de reacció al voltant dels 700 s^{-1} per a constants de velocitat de primer ordre, i per a reaccions de segon ordre o ordres superiors, encara pot ser major en funció de la concentració dels reactius. Els enzims són molt bons catalitzadors, amb valors de k_{cat} en el marge de 1 a 10^7 s^{-1} , tot i que en la majoria dels casos són inferiors a 1000 s^{-1} , de manera que normalment l'aplicació d'aquest tipus de tècniques és un bon recurs per a l'estudi del mecanisme enzimàtic.

Generalment el procés observat en estat preestacionari és un canvi de velocitat de primer ordre que respon a la formació d'un nou intermedi enzim-lligand, i el curs de la cinètica sol prendre una forma exponencial, amb una constant de velocitat que és independent de la concentració d'enzim. La forma de la cinètica de reacció, així com la dependència de la constant de velocitat i l'amplitud de la fase d'acumulació (de l'anglès *burst*) amb la concentració d'enzim o substrat, són les eines que s'empren per a l'estudi del mecanisme.

És important tenir present que un requeriment necessari que han d'acomplir els resultats derivats de les cinètiques en estat preestacionari és que també expliquin el comportament de l'enzim en estat estacionari. De vegades, quan el mecanisme és complex no sempre es pot resoldre només a partir dels experiments en estat preestacionari, i es fa necessària l'anàlisi conjunta dels resultats obtinguts a partir de diferents estudis cinètics, però fins i tot en aquests casos, els resultats permeten si no construir tot el mecanisme, si descartar-ne alguns. El cas de la concaivalina A [390-398] i el de la glucoamilasa [399-422] són dos exemples clars, dins del món de les proteïnes que uneixen carbohidrats, de com en pot arribar a ser de complexa la proposta d'un mecanisme que permeti explicar de manera satisfactòria, ja sigui un mecanisme

d'unió proteïna-lligand o un mecanisme enzimàtic. L'estudi dels mecanismes d'aquestes dues proteïnes, que ha mobilitzat diversos grups de treball i que ha generat una gran quantitat de dades experimentals, es tracten amb detall a l'apèndix 1.

5.1.1. Unió proteïna-carbohidrat

L'estudi del procés d'unió proteïna-carbohidrat en estat preestacionari sol realitzar-se per seguiment dels canvis d'absorbància a 280 nm dels residus aromàtics de les proteïnes en unir el lligand; tot i així, en alguns casos es fan servir les variacions d'absorbància o fluorescència d'un lligand cromofòric. Malgrat la complexitat observada en els casos de la Concanavalina A i de la glucoamilasa, la determinació del mecanisme d'unió per a d'altres glicosidases ha estat més senzilla. Per exemple, el cas de la β -glucosidasa d'ametlla [423], la β -galactosidasa d'*Escherichia coli* [314] i el lisozim de clara d'ou [424, 425], que també revelen models d'unió amb més d'una etapa, es comprova que posteriorment a l'etapa d'unió bimolecular hi ha implicades etapes d'isomerització. En el cas del lisozim a més es comprova que les cinètiques d'unió varien amb el pH [425].

5.1.2. Determinació del mecanisme de catàlisi

En l'estudi de les etapes catalítiques pròpiament dites, se sol seguir la formació d'algun dels productes de reacció. En aquest cas, la fase d'acumulació de producte generalment és indicativa de l'acumulació d'un intermedi de reacció, definint d'aquesta manera un mecanisme de reacció en què la catàlisi transcorre, com a mínim, en dues etapes. Cal tenir present, però, que el fet de no observar aquesta fase d'acumulació no sempre és sinònim d'una única etapa d'hidròlisi, sinó que també pot donar-se en un mecanisme en dues etapes amb velocitats comparables o on la darrera etapa és més ràpida que la primera. En aquests casos la cinètica en comptes de ser exponencial, és lineal i el que s'observa és directament la velocitat d'estat estacionari. Si es tracta d'un mecanisme de dues etapes ràpides, es pot arribar a veure la fase d'acumulació jugant amb les condicions de reacció o fent servir mutants o substrats per als que la velocitat de la segona etapa passa a ser determinant de la velocitat de reacció. Per exemple, en el cas de la β -galactosidasa d'*Escherichia coli* algunes de les primeres demostracions que el mecanisme té lloc a través d'un intermedi de reacció es van obtenir seguint les cinètiques d'estat preestacionari a temperatures subòptimes [426] o en absència d'un dels cations divalents que afavoreixen la catàlisi de la reacció [427].

Dins del camp de les glicosidases la utilitat principal d'aquest tipus de cinètiques ha estat com a complement dels estudis en estat estacionari per a l'avaluació de la cinètica d'hidròlisi de diferents substrats o mutants: β -glucosidasa d'*Aspergillus wentii* [309], β -galactosidasa *ebg^b* d'*Escherichia coli* [428], β -galactosidasa *lacZ* d'*Escherichia coli* [31, 310], β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* [30, 429], α -galactosidasa de *Trichoderma reesei* [430], xilanasa A de *Pseudomonas fluorescens* subespècie *cellulosa* [431], β -1,4-glicosidasa de *Cellulomonas fimi* [97], xilanasa de *Bacillus circulans* [432]; i especialment com a suport dels resultats obtinguts en les anàlisis de Hammett tant d'enzims salvatges com de mutants: β -N-acetilglucosaminidasa d'*Aspergillus niger* [433], xilanasa de *Bacillus circulans* [117, 374], exoglucanasa/xilanasa de *Cellulomonas fimi* [38, 434], β -xilosidasa de *Bacillus stearothermophilus* [435]. També

s'ha aplicat a la valoració de centres actius, com es va fer en el cas de dos mutants en el nucleòfil en dues glicosidases diferents, la xilanasas de *Bacillus circulans* [373] i la β -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* [436].

5.2. Cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

L'estudi de les cinètiques en estat preestacionari de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* s'ha emprés des de dos punts de vista diferents. D'una banda s'ha buscat avaluar les cinètiques d'unió enzim-substrat, mesurant els canvis de fluorescència de la proteïna en unir oligosacàrids no-cromofòrics de baix pes molecular que actuen com a substrats o inhibidors de l'enzim, i guarden una elevada similitud amb el substrat natural de l'enzim. La proposta inicial era aplicar l'estudi tant a l'enzim salvatge, com al mutant E134A de la β -glucanasa, que és un mutant inactiu, en què el residu que fa el paper de nucleòfil s'ha mutat a alanina. En aquest mutant el mecanisme enzimàtic s'atura abans de la primera etapa catalítica, de manera que la informació que proporciona es limita a l'etapa d'unió. El fet de complementar l'estudi amb les cinètiques amb l'enzim salvatge hauria de proporcionar informació addicional sobre les etapes catalítiques. D'altra banda, s'ha plantejat realitzar cinètiques amb substrats cromofòrics, per tal d'estudiar el mecanisme catalític de l'enzim salvatge a partir de l'alliberament de l'aglicona cromofòrica.

Amb aquests propòsits, i prèviament a l'estudi cinètic de l'enzim s'han d'expressar tant l'enzim salvatge com el mutant E134A en quantitats de desena de mg (ja que els experiments en estat preestacionari consumeixen gran quantitat d'enzim), i s'han de sintetitzar els substrats utilitzats tal i com s'indica al capítol de síntesi de substrats. Les cinètiques en estat preestacionari s'han dut a terme emprant un aparell de flux interromput, on una dissolució d'enzim de concentració coneguda s'ha fet reaccionar amb una tanda de dilucions seriades d'una dissolució de substrat. El seguiment de les cinètiques amb substrats i inhibidors oligosacàrids de baix pes molecular, per canvis de fluorescència de la proteïna que s'havia plantejat en un principi, no ha estat possible, ja que no s'han observat canvis de senyal en el procés. En mesurar canvis de fluorescència de la proteïna, el que s'està realitzant a la pràctica és determinar els canvis d'entorn que es donen al voltant dels residus de triptòfan. En base a l'estructura tridimensional de la 1,3-1,4- β -glucanasa s'observa que dels vuit triptòfans que té la proteïna, només quatre estan situats al centre actiu, i només un d'ells, que es troba al subseti +1, el triptòfan 221, interacciona directament amb el substrat [187] (figura 5.1). Si bé no és necessari que hi hagi una interacció directa amb el substrat perquè es doni un canvi d'entorn al voltant d'un residu, el més probable és que aquells residus que entren en contacte amb el substrat siguin els que experimenten un canvi d'entorn més considerable. Així doncs, és possible que a la 1,3-1,4- β -glucanasa només un dels triptòfans estigui canviant d'entorn en unir el substrat, i que aquest canvi no sigui prou significatiu per tal de mesurar un canvi de senyal de la proteïna en unir oligosacàrids de baix pes molecular. Com a conseqüència, les cinètiques només s'han estudiat seguint els canvis de fluorescència o absorbància dels substrats cromofòrics.

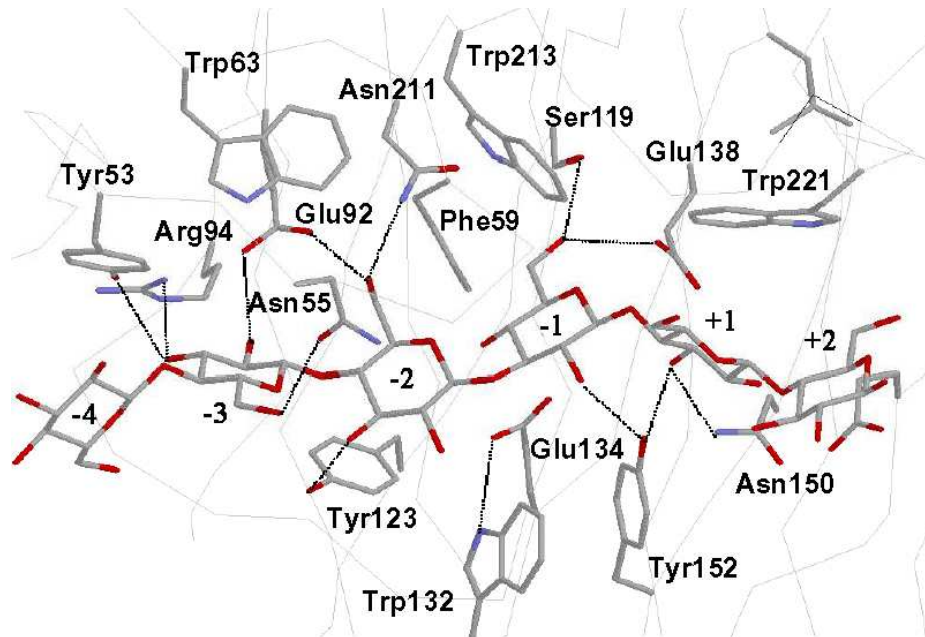


Figura 5.1. Esquema del centre actiu de la β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, en què es mostra el modelatge d'un hexasacàrid. Dels quatre triptòfans que es mostren a l'esquema només el Trp221, situat en el subseti +1, interacciona directament amb el substrat.

5.2.1. Cinètiques d'unió amb el mutant E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Les cinètiques en estat preestacionari amb el mutant inactiu E134A donen informació sobre la unió enzim-substrat. Les cinètiques s'han seguit enregistrant la variació de fluorescència del substrat G4G3G-MU en unir-se a l'enzim, i la traça final de cada cinètica s'ha obtingut com a mitjana de 4-5 traces individuals.

Per tal d'assegurar que el canvi de fluorescència observat es deu a la unió del substrat i no a l'alliberament de 4-metilumbel·liferona, causada per una possible contaminació per enzim salvatge, s'han seguit les cinètiques de dues formes diferents. Fent servir una longitud d'ona d'excitació de 360 nm i un filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm només s'obté senyal per part del producte de la reacció, la 4-metilumbel·liferona, mentre que excitant a 350 nm i seguint l'emissió amb un filtre de longitud d'ona de tall de 400 nm s'obté senyal tant del substrat, com del producte d'hidròlisi. En els experiments d'unió que s'han realitzat a les primeres condicions (exc. 360 nm, em. > 455 nm) no s'observa cap canvi de fluorescència, això d'una banda descarta la contaminació per enzim salvatge, i de l'altra, verifica que els resultats obtinguts amb el mutant E134A a les altres condicions (exc. 350 nm, em. > 400 nm) són deguts a la unió proteïna-carbohidrat. Aquest resultat també té rellevància a l'hora d'interpretar les cinètiques d'estat preestacionari amb l'enzim salvatge, que se segueixen fent servir una longitud d'ona d'excitació de 360 nm i un filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm. En aquest cas, permet descartar que el canvi de senyal obtingut en treballar amb l'enzim salvatge sigui degut a un canvi de fluorescència causat per la unió enzim-substrat. A la figura 5.2 es resumeixen a nivell esquemàtic aquestes primeres conclusions sobre les que es basen les interpretacions posteriors de les dades obtingudes en els diferents experiments.

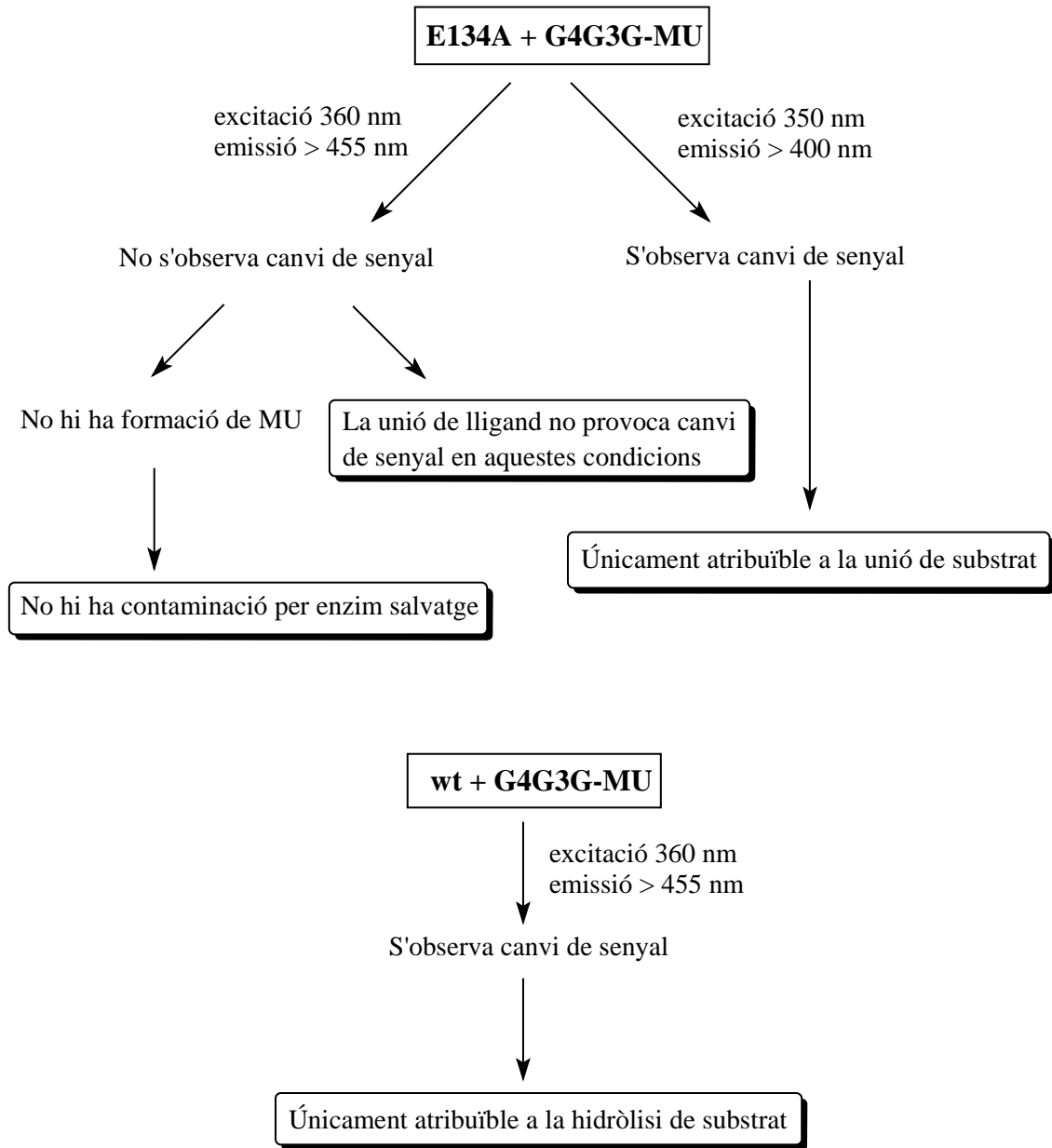


Figura 5.2. Resultats dels experiments preliminars realitzats per mesura de fluorescència en diferents condicions, que senten la base per a la interpretació posterior dels resultats.

Seguint la unió a una longitud d'ona d'excitació de 350 nm i amb un filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 400 nm, sí que s'ha observat un canvi de fluorescència. La cinètica descriu una primera fase de retardament (de l'anglès *lag*) que dura aproximadament 30 ms, en què no s'observa cap canvi de fluorescència, seguit per una disminució monoexponencial del senyal en una fase d'acumulació d'algun intermedi glicosil-enzim, d'acord amb l'equació 5.1, fins assolir l'equilibri (figura 5.3).

$$\Delta F([S], t) = \Delta F([S], \infty) \cdot [1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)] \quad \text{Equació 5.1.}$$

on $\Delta F([S],t)$ és el canvi de fluorescència observat a una concentració de substrat $[S]$ i a un temps t , $\Delta F([S],\infty)$ és el canvi de fluorescència màxim que es dona un cop establert l'equilibri, i la k_{obs} és la constant de velocitat de primer ordre que descriu el procés en estat preestacionari. Els resultats obtinguts tant en la fase de retardament com en la fase d'acumulació es mostren a la taula 5.1, on el canvi de senyal s'expressa com a concentració de substrat unit a l'enzim emprant una recta patró de G4G3G-MU realitzada en l'aparell de flux interromput; i fent l'assumpció que el substrat perd completament la seva fluorescència en unir-se a l'enzim.

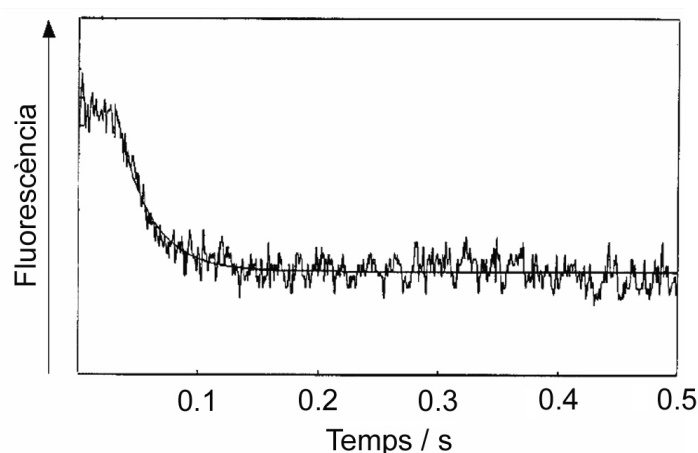


Figura 5.3. Traça típica obtinguda després de barrejar el substrat G4G3G-MU amb el mutant E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* en un aparell de flux interromput. Es mesura el canvi de fluorescència al llarg del temps amb una longitud d'ona d'excitació de 350 nm i amb un filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 400 nm. Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl_2 , 30 °C, $[\text{E134A}] = 23.7 \mu\text{M}$, $[\text{substrat}] = 0.05\text{-}6.4 \text{ mM}$.

Taula 5.1. Resum dels resultats de les cinètiques en estat preestacionari del mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el substrat G4G3G-MU. A la taula s'indica a cada concentració de substrat la durada de la fase de retardament; i per a la fase d'acumulació, la constant de velocitat del canvi de senyal (k_{obs}), i el canvi de senyal màxim obtingut (ΔSenyal) expressat en concentració de substrat unit. Condicions de reacció: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl_2 a 30 °C, $[\text{E134A}] = 23.7 \mu\text{M}$. Longitud d'ona d'excitació: 350 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 400 nm (GG400), factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència vs $[\text{G4G3G-MU}] = 1.95 \text{ mV} \cdot \mu\text{M}^{-1}$.

[G4G3G-MU] / mM	Fase de retardament	Fase d'acumulació	
	Durada / ms	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$\Delta\text{Senyal} / \mu\text{M}$
0.05	38	138 ± 13	0.6
0.1	37	80 ± 10	1.1
0.2	38	28 ± 2	2.1
0.4	23	21.8 ± 0.7	3.9
0.8	30	28.4 ± 0.6	8.3
1.61	26	17.5 ± 0.5	18.2
3.21	33	17.9 ± 0.6	26.5
4.28	33	29.4 ± 0.9	31.7
5.14	28	31 ± 2	27.8
6.42	30	9.7 ± 0.3	36.1

Interpretació de resultats*Fase de retardament*

El primer esdeveniment detectat en resposta a la barreja del mutant amb el substrat descriu una fase de retardament de la cinètica en què no s'observa cap canvi en la fluorescència del substrat, i que es caracteritza per tenir sempre la mateixa durada, al voltant de 30 ms, independentment de la concentració de substrat emprada. Considerant que en el moment que deixa de fer-se present la fase de retardament el procés que la genera pràcticament ha finalitzat, és a dir que s'han assolit unes 4 vegades el temps de vida mitja (corresponent al 94% de la reacció), i que aquesta fase dura aproximadament 30 ms, la constant de velocitat aparent d'aquesta fase (k_{obs}) és d'aproximadament 100 s^{-1} . Aquesta primera fase, que s'ha observat en totes les cinètiques realitzades, incloent les cinètiques amb enzims actius, sembla ser necessària per a la formació del complex enzim-substrat productiu.

La manca de dependència de la constant de velocitat observada amb la concentració de substrat descarta que aquesta fase reflecteixi l'etapa bimolecular de formació del complex productiu, ja que per a aquest mecanisme (figura 5.4) la k_{obs} depèn de la concentració de substrat a no ser que es treballi a una concentració del mateix molt inferior a la constant de dissociació del complex (equació 5.2).

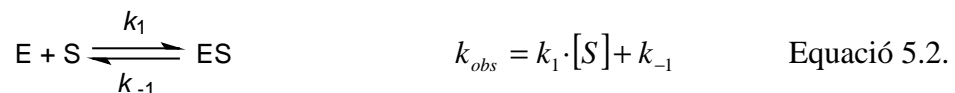


Figura 5.4. Mecanisme que reflecteix l'etapa d'unió bimolecular enzim-substrat i equació de velocitat associada.

Generalment, la manca de dependència de la constant de velocitat enfront de la concentració de substrat en estat preestacionari sol associar-se a una etapa de canvi conformacional. A la figura 5.5 es presenten dos mecanismes senzills, que en unes condicions concretes podrien explicar aquesta manca de dependència, juntament amb les equacions de k_{obs} associades.

$E \xrightleftharpoons[K_1]{S} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} ES^*$ <p><i>ràpida</i> <i>lenta</i></p>	$k_{obs,retardament} = \frac{k_2}{1 + \frac{K_1}{[S]}} + k_{-2}$ <p>Equació 5.3.</p>
$E \xrightleftharpoons[k_{-0}]{k_0} E^* \xrightleftharpoons[K_1]{S} ES^*$ <p><i>lenta</i> <i>ràpida</i></p>	$k_{obs,retardament} = \frac{k_{-0}}{1 + \frac{[S]}{K_1}} + k_0$ <p>Equació 5.4.</p>

Figura 5.5. Models proposats per tal d'explicar la fase de retardament en les cinètiques d'unió del G4G3G-MU amb el mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, i equacions de velocitat associades. Les espècies ES i ES*, així com les espècies E i E* estan relacionades a través d'una etapa de canvi conformacional.

En el primer mecanisme es proposa que en resposta a la unió ràpida de substrat es doni un canvi conformacional lent del nou complex format. Aquest canvi conformacional pot donar-se en l'enzim, en el lligand o bé ser un reposicionament del lligand. En qualsevol dels casos, per tal que la k_{obs} sigui independent de la concentració de lligand s'ha de treballar a una concentració del mateix, o bé molt superior, o bé molt inferior, a la K_1 (equació 5.3). Com s'han fet servir concentracions de substrat en el rang de mM, al voltant del valor de K_M per a l'enzim salvatge, sembla que l'opció més probable és que la concentració de substrat sigui molt superior a la K_1 , i en aquest cas, la constant de velocitat observada correspondria al sumatori de les dues constants de velocitat de l'etapa lenta ($k_2 + k_{-2}$). En el segon mecanisme de la figura 5.5 es proposa que l'enzim lliure té dues conformacions diferents, la conformació E és la més estable, però només la conformació E* pot unir substrat, de manera que és necessari que es doni el canvi conformacional, abans de la seva unió. Aquest seria un altre cas de canvi conformacional induït per la unió del substrat, en què l'etapa de canvi conformacional que és més lenta que l'etapa bimolecular d'unio, determina la velocitat del procés. El fet que la conformació més estable sigui E comporta que en el model proposat, k_0 és molt inferior a k_{-0} . A l'igual que en el cas anterior per tal de poder explicar els resultats, la concentració de substrat ha de ser molt superior o bé molt inferior a K_1 (equació 5.4), i considerant més probable la primera possibilitat, la constant de velocitat observada correspondria a la k_0 , la constant de formació d'E*.

Amb les dades de què es disposa no és possible discernir entre els dos models proposats. En qualsevol dels casos, la unió del substrat a l'enzim no faria canviar l'entorn de l'aglicona aromàtica de forma significativa, ja que en aquesta fase no s'observa canvi de fluorescència.

Fase d'acumulació

Després de la fase de retardament, el decaïment monoexponencial de la intensitat de fluorescència es caracteritza per una constant de velocitat que disminueix amb la concentració de substrat (taula 5.1, figura 5.6). Aquest resultat no és compatible amb una única etapa bimolecular d'unio enzim-substrat, que mostraria una dependència lineal de la constant de velocitat amb la concentració de substrat, ni amb una unió en dues etapes amb canvi conformacional associat a la unió de substrat, ja que en aquest cas la dependència de la constant de velocitat amb la concentració de substrat seria hiperbòlica.

D'altra banda, l'amplitud d'aquesta etapa depèn de forma hiperbòlica de la concentració de substrat (taula 5.1, figura 5.7), i el fet que el pendent del gràfic de Hill, corresponent al logaritme de la variació de fluorescència relativa respecte del logaritme de la concentració de substrat, sigui superior a 1 (figura 5.7), indica la unió de més d'una molècula de substrat a l'enzim.

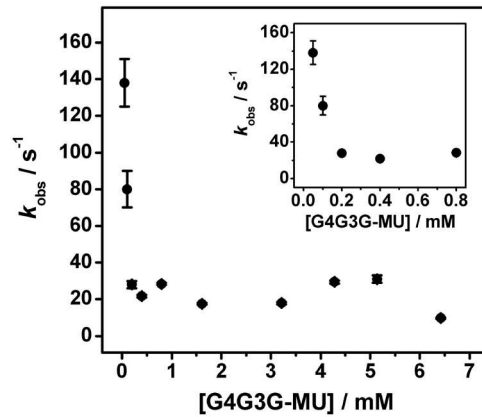


Figura 5.6. Dependència de la constant de velocitat amb la concentració de substrat per a la fase d'acumulació, en el seguiment del canvi de fluorescència del G4G3G-MU en unir-se al mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl_2 , 30 °C.

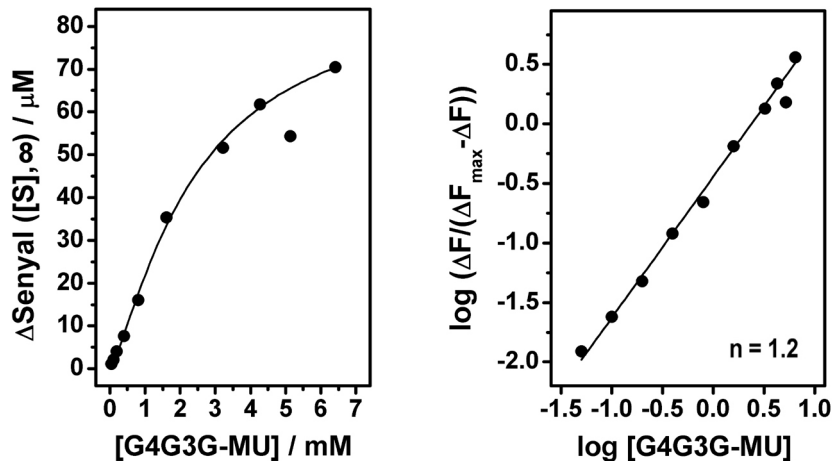


Figura 5.7. Paràmetres associats a la fase d'acumulació en la unió del G4G3G-MU amb el mutant E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Esquerra: Dependència de l'amplitud del canvi de fluorescència del G4G3G-MU observat en assolir l'equilibri ($\Delta F([S], \infty)$) amb la concentració de substrat. Dreta: Gràfic de Hill associat, basat en els valors d'equilibri del canvi de fluorescència del substrat, on ΔF és el canvi de senyal assolit a l'equilibri, i ΔF_{\max} és el valor obtingut en l'ajust de l'equació sigmoïdal de Hill per als valors representats al gràfic de la dreta; el coeficient de Hill és de 1.2. Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl_2 , 30 °C.

El model més senzill que permet explicar els resultats d'aquesta fase és un model en què després d'una primera unió de substrat es produeix un canvi conformacional, seguit per la unió d'una segona molècula de substrat, en què l'etapa lenta correspon al canvi conformacional (figura 5.8). El canvi de fluorescència va lligat al canvi conformacional, de manera que la fluorescència del substrat en els complexos ES^* i ES_2^* és diferent a la del substrat en dissolució i a la del complex ES . D'aquesta manera, el canvi de senyal augmenta amb la concentració de substrat fins que arriba a saturació en establir-se l'equilibri del canvi conformacional.

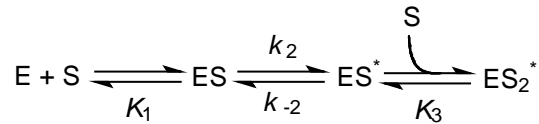


Figura 5.8. Mecanisme proposat per a la fase d'acumulació en la cinètica d'unió del substrat G4G3G-MU al mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Els dos complexos ES i ES* estan relacionats per una etapa lenta de canvi conformacional.

L'equació 5.5 recull l'expressió de k_{obs} per a aquesta segona fase (equació deduïda a l'apèndix 2).

$$k_{obs,acumulació} = \frac{k_2}{1 + \frac{K_1}{[S]}} + \frac{k_{-2}}{1 + \frac{[S]}{K_3}} \quad \text{Equació 5.5.}$$

En base a aquest model, per tal d'explicar que la k_{obs} sigui una funció decreixent amb la concentració de substrat, aquesta ha de ser molt més gran que K_1 , i ha de variar al voltant de K_3 . L'ajust d'aquesta equació als resultats obtinguts permet obtenir els següents resultats: $k_2 \approx 15 \text{ s}^{-1}$, $k_{-2} \approx 175 \text{ s}^{-1}$, $K_1 \approx 0.01 \text{ mM}$ i $K_3 \approx 0.05 \text{ mM}$.

Model complet d'unió: fase de retardament+ fase d'acumulació

El plantejament d'un model complet que descriu el comportament global observat en la unió enzim-ligand comporta la integració dels mecanismes proposats per a la fase de retardament i la d'acumulació. De manera que els dos models que s'han plantejat per tal d'explicar la fase de retardament permeten la proposta de dos models diferents per a la descripció de la unió del G4G3G-MU al mutant inactiu E134A.

En un primer cas, es proposa que com a resposta a la unió d'una molècula de substrat a l'enzim de forma no-productiva es dona un canvi conformacional que permet la unió productiva del substrat al centre actiu, després de la qual es dona un segon canvi conformacional que porta a la unió d'una tercera molècula de substrat a l'enzim (figura 5.9).

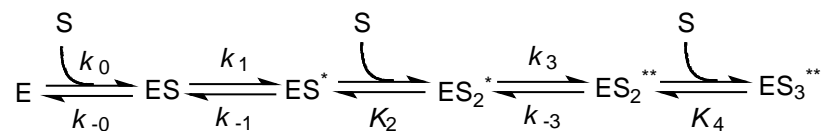


Figura 5.9. Model proposat per a la unió del substrat G4G3G-MU al mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

La unió simultània de tres molècules de substrat al centre actiu de la 1,3-1,4- β -glucanasa és altament improbable, de manera que aquest model implicaria l'existència d'un centre d'unió de lligand accessori. A la bibliografia es troben els casos de l'amilosacarasa de *Neisseria polysaccharea* [130] i d'una exo- β -1,3-glucanasa de mamífer [437] per a les que s'ha observat que a més del centre actiu presenten un seti

d'unió de substrat a la superfície enzimàtica al que s'ha d'unir el substrat, prèviament a la formació del complex productiu al centre actiu. Els dos grups postulen que la unió al centre d'unió accessori provocaria un canvi conformacional a l'enzim fent possible la transferència del substrat, que es troba al centre d'unió extern, cap al centre actiu per tal de formar el complex productiu. També s'han descrit setis d'unió externs en el cas d'altres glicosidases que hidrolitzen substrats polisacàridics [60, 438-442]. A més de l'efecte sobre l'obertura del centre actiu, es proposa que la funció d'aquests centres d'unió a la superfície enzimàtica pugui anar lligada a la hidròlisi processiva del substrat, o simplement augmentant la concentració efectiva de substrat a l'entorn enzimàtic. En el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, a les estructures cristal·logràfiques de complexos amb lligands no s'ha observat la presència d'un centre d'unió extern al centre actiu. Tot i així no es pot assegurar que no existeixi, sobretot tenint en compte que en algun dels exemples esmentats, aquest centre d'unió extern no s'ha fet evident més que a l'estructura d'algun dels mutants.

El segon model implica el desplaçament d'un equilibri prèviament existent entre les poblacions de dues conformacions enzimàtiques com a resposta a la unió del substrat al centre actiu per tal de formar el complex productiu; aquest al seu torn està sotmès a un canvi conformacional que comporta la unió d'una segona molècula de substrat (figura 5.10). Perquè aquesta primera etapa d'equilibri entre les dues conformacions enzimàtiques es faci evident a les cinètiques la conformació E ha de ser molt més estable que la conformació E*, però ha de ser incapaç d'unir substrat, de forma que el que es mesura a l'etapa de retardament sigui l'establiment d'un nou equilibri poblacional induït per la presència del substrat.

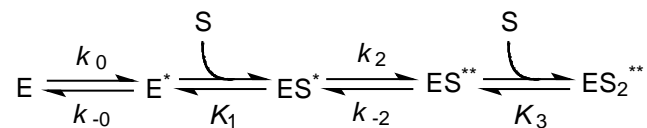


Figura 5.10. Model proposat per a la unió del substrat G4G3G-MU al mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Aquest model és més senzill i alhora més lògic que l'anterior. A més, en aquest model el baix valor de K_1 obtingut a partir dels resultats de la fase d'acumulació (≈ 0.01 mM) és consistent amb la manca de dependència de la constant de velocitat associada a la fase de retardament amb la concentració de substrat.

Donat que la deducció de mecanismes a partir de cinètiques en estat preestacionari parteix de la base de proposar el mecanisme més senzill capaç d'explicar els resultats i ja que el model de la figura 5.9 sembla més improbable, es proposa que la unió segueix el model que es mostra a la figura 5.10. Així doncs, la unió de substrats cromofòrics al mutant E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* queda definida per un mecanisme de quatre etapes en què es van alternant dues etapes d'unió de substrat amb dues etapes de canvi conformacional, que són totes dues més lentes que les etapes bimoleculares.

5.2.2. Cinètiques en estat preestacionari de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb diferents substrats

Experiments preliminars

Les cinètiques d'hidròlisi s'estudien fent servir substrats amb l'estructura bàsica $(G4)_nG3G-X$, amb $n = 0-3$ i on X és un cromòfor o un fluoròfor. En aquests experiments s'estudia l'alliberament del producte de reacció per fluorescència (en el cas de la 4-metilumbel·liferona) o per absorbància (en el cas dels 3,4-dinitrofenol i 2,4-dinitrofenol). L'aspecte general de les traces (obtingudes com a mitjana de 4-5 traces per reacció) és molt similar independentment del substrat emprat (figura 5.11) i recorda l'observat en el cas de la unió del substrat al mutant inactiu. Després d'una fase de retardament d'aproximadament 30 ms, hi ha una fase d'acumulació de producte la velocitat de la qual decau de forma monoexponencial fins assolir la velocitat d'estat estacionari, d'acord amb l'equació 5.6.

$$\Delta \text{Senyal}([S], t) = \Delta \text{Senyal}_p \cdot [1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)] + v_{ss} \cdot t \quad \text{Equació 5.6.}$$

on $\Delta \text{Senyal}([S], t)$, és el canvi de senyal associat a una concentració de substrat concreta $[S]$, a un temps, t , ΔSenyal_p és el canvi de senyal que es dona en estat preestacionari, obtingut per extrapolació de la velocitat en estat estacionari a temps inicial, v_{ss} és la velocitat en estat estacionari, i k_{obs} és la constant de velocitat de primer ordre observada, que descriu el comportament en estat preestacionari.

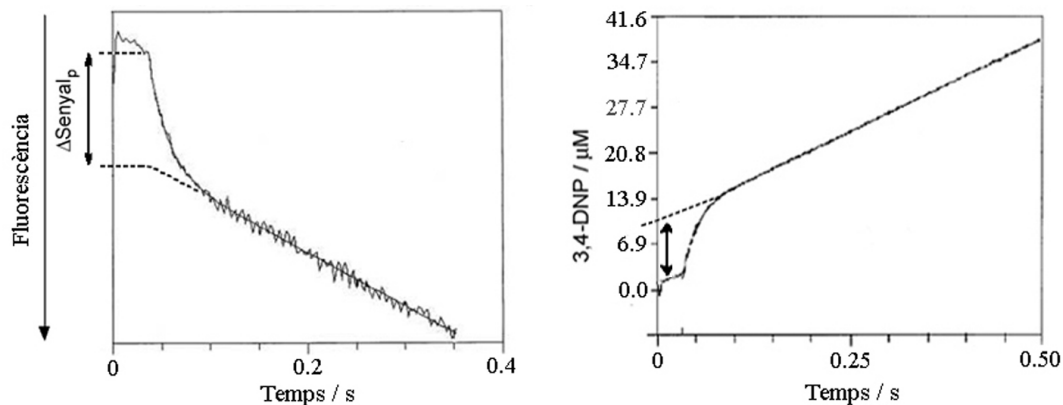


Figura 5.11. Cinètiques en estat preestacionari de l'enzim salvatge de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Esquerra. Traça obtinguda mesurant l'emissió de fluorescència per sobre de 455 nm en la reacció amb els substrats d'estructura $(G4)_nG3G-MU$, amb $n = 1-3$. Dreta: Traça obtinguda mesurant l'absorbància a 400 nm per a la reacció amb el substrat $G4G3G-3,4DNP$. Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, pH 7.2, 0.1 mM $CaCl_2$, 30 °C.

El fet que en les cinètiques d'hidròlisi la fase de retardament tingui una durada aproximada de 30 ms sense que depengui ni del tipus de substrat emprat ni de la seva concentració, igual que en les cinètiques d'unió amb el mutant E134A, fa pensar que el procés que la causa és un tret general de les cinètiques de la 1,3-1,4- β -glucanasa. A més, algunes cinètiques s'han realitzat en dos aparells de flux interromput diferents, mostrant

sempre el mateix aspecte, i descartant d'aquesta manera que la fase de retardament observada sigui un artefacte instrumental. Finalment, els valors de v_{ss} obtinguts a partir de les traces es correspon amb els resultats obtinguts al grup a partir de cinètiques en estat estacionari per a aquests mateixos substrats [206, 208], validant, d'aquesta manera, la metodologia emprada.

Les cinètiques es realitzen en presència de Ca^{2+} , que és un catió que s'uneix a la part còncava de la 1,3-1,4- β -glucanasa, estabilitzant-la. Donat que s'han descrit casos en què la unió de cations a les proteïnes comporten canvis conformacionals a les mateixes, i que a les cinètiques d'unió amb el mutant inactiu es proposa la presència d'una etapa lenta de canvi conformacional, s'estudia el paper que pugui jugar la unió d'aquest catió en el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa. D'una banda s'han realitzat experiments en presència i en absència de Ca^{2+} , i de l'altra s'ha assajat un canvi de tampó de citrat/fosfat, amb capacitat quelant, a MOPS, sense capacitat quelant. En tots els experiments les traces adopten la mateixa forma i no mostren cap tipus de dependència de la concentració de Ca^{2+} .

S'ha estudiat també l'efecte de variar la concentració enzimàtica en les cinètiques en estat preestacionari. Es comprova que el canvi màxim de senyal associat a l'etapa d'acumulació segueix una relació lineal creixent amb la concentració d'enzim, mentre que la k_{obs} n'és independent, tal i com s'escau en aquest tipus d'experiment.

Resultats

Cinètiques amb substrats de diferent grau de polimerització

Per tal de determinar la influència del grau de polimerització del substrat en les cinètiques en estat preestacionari s'ha fet servir una família de 4'-metilumbel-liferil glicòsids d'estructura bàsica $(G4)_nG3G-MU$, des del disacàrid fins al pentasacàrid. D'aquesta manera, partint de l'estructura bàsica per ser substrat de la 1,3-1,4- β -glucanasa, s'avalua l'efecte de l'extrem no reductor del substrat en l'establiment de l'estat estacionari.

Amb tots els substrats, tret del disacàrid, s'observa la mateixa cinètica. En el cas del disacàrid ($n = 0$) no s'observa cap canvi de senyal durant els primers 20 segons de reacció. Hi ha tres possibles explicacions per a la manca de canvi de senyal: bé el substrat és massa petit per tal d'induir el canvi que s'observa amb els altres substrats, bé la cinètica és més ràpida que en el cas dels altres substrats i s'observa directament l'estat estacionari, o bé la cinètica és suficientment lenta com perquè no s'observi durant el període de temps estudiat. Donat que aquest és el pitjor de tots els substrats emprats i que amb aquest substrat en el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus macerans* s'observen cinètiques amb una fase de retardament en l'ordre de temps de les desenes de minuts [212], sembla que l'opció més plausible sigui la darrera. Tot i així, el fet que amb la β -glucanasa de *Bacillus macerans* després de la fase de retardament s'observi directament l'estat estacionari, a diferència del que s'ha observat en la hidròlisi dels altres substrats amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, no permet descartar la possibilitat que l'estructura del disacàrid no sigui suficient com per generar el procés que dona lloc a l'acumulació de producte de reacció.

Per als altres tres 4'-metilumbel·liferil glicòsids s'observa una fase de retardament, de 30 ms de durada aproximada, que és independent de la concentració de substrat. A continuació s'observa la fase d'acumulació de producte (figura 5.11), amb uns paràmetres d'estat preestacionari molt similars per a tots ells, amb una k_{obs} entre 40 i 60 s^{-1} que no depèn significativament de la concentració de substrat, i una amplitud creixent amb la concentració de substrat, tot i que força inferior a la concentració de centres actius de la 1,3-1,4- β -glucanasa (taula 5.2). Finalment la traça mostra la velocitat d'estat estacionari, que com és d'esperar depèn de la concentració del substrat (taula 5.3). A la taula 5.2 es recullen els paràmetres d'estat preestacionari, on l'amplitud de la fase d'acumulació de producte s'expressa com a concentració de producte format (ΔP), emprant el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència de la 4-metilumbel·liferona.

Taula 5.2. Dependència dels paràmetres d'estat preestacionari k_{obs} i ΔP (amplitud de la fase d'acumulació expressada com a concentració de producte format emprant el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència) amb la concentració de substrat en el cas dels substrats amb estructura bàsica $(G4)_nG3G\text{-MU}$, on $n = 1\text{-}3$. Condicions de reacció: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl_2 , 30 °C, $[E] = 8.9 \mu\text{M}$ per a les reaccions amb els penta- i tetrasacàrid, **70** i **23**, i $[E] = 11.9 \mu\text{M}$ per a la reacció amb el trisacàrid **18**. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm.

<i>Constant de velocitat de la fase d'acumulació de producte</i>					
G4G3G-MU (18)		G4G4G3G-MU (23)		G4G4G4G3G-MU (70)	
[S] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	[S] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	[S] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
4.88	60 ± 4	1.97	53 ± 4	0.835	41 ± 2
3.25	58 ± 2	1.29	50 ± 2	0.556	45 ± 2
2.45	60 ± 3	0.985	44 ± 3	0.418	48 ± 3
1.63	62 ± 2	0.493	37 ± 3	0.209	36 ± 3
1.25	63 ± 3	0.246	40 ± 3	0.104	39 ± 4
0.63	59 ± 2	0.123	33 ± 3	0.052	45 ± 7
0.31	57 ± 3	0.062	30 ± 3	0.026	43 ± 13
		0.031	17 ± 6		

<i>Amplitud de la fase d'acumulació relativa a la concentració d'enzim</i>					
G4G3G-MU (18)		G4G4G3G-MU (23)		G4G4G4G3G-MU (70)	
[S] / mM	$\Delta P/[E]_0$	[S] / mM	$\Delta P/[E]_0$	[S] / mM	$\Delta P/[E]_0$
4.88	0.060	1.97	0.055	0.835	0.046
3.25	0.087	1.29	0.051	0.556	0.034
2.45	0.062	0.985	0.046	0.418	0.026
1.63	0.061	0.493	0.031	0.209	0.021
1.25	0.056	0.246	0.025	0.104	0.012
0.63	0.037	0.123	0.020	0.052	0.008
0.31	0.027	0.062	0.015	0.026	0.003
		0.031	0.006		

Taula 5.3. Dependència amb la concentració de substrat de la velocitat d'estat estacionari (v_{ss}), obtinguda ajustant l'equació 5.6 a les traces, en el cas dels substrats amb estructura bàsica $(G4)_nG3G$ -MU, on $n = 1-3$. La velocitat s'expressa com a $M \cdot s^{-1}$, emprant el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència. Condicions de reacció: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, pH 7.2, 0.1 mM $CaCl_2$, 30 °C, $[E] = 8.9 \mu M$ per a les reaccions amb els penta- i tetrasacàrid, **70** i **23**, i $[E] = 11.9 \mu M$ per a la reacció amb el trisacàrid **18**. Longitud d'ona d'excitació: 360 nm, filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm.

G4G3G-MU (18)		G4G4G3G-MU (23)		G4G4G4G3G-MU (70)	
[S] / mM	$10^5 \cdot v_{ss} / M \cdot s^{-1}$	[S] / mM	$10^5 \cdot v_{ss} / M \cdot s^{-1}$	[S] / mM	$10^5 \cdot v_{ss} / M \cdot s^{-1}$
4.88	0.282	1.97	0.175	0.835	0.193
3.25	0.318	1.29	0.182	0.556	0.181
2.45	0.326	0.985	0.183	0.418	0.166
1.63	0.308	0.493	0.164	0.209	0.107
1.25	0.275	0.246	0.110	0.104	0.066
0.63	0.215	0.123	0.069	0.052	0.039
0.31	0.136	0.062	0.036	0.026	0.018
		0.031	0.021		

Cinètiques amb el G4G3G-MU a pH 6.9 i 7.8

Per tal de determinar si l'etapa que dona lloc a l'acumulació de producte és l'etapa de glicosidació (que és l'etapa determinant de la velocitat de reacció en estat estacionari) es decideix realitzar dos experiments més amb el substrat G4G3G-MU a dos pH diferents, de forma que canviï l'estat de ionització d'un dels residus catalítics. La variació de la k_{obs} en funció del grau de ionització del residu en qüestió, seguint el mateix comportament que la k_{cat} en les cinètiques en estat estacionari, indicaria que la glicosidació és la causant de la fase d'acumulació de producte. Donat que el pK_a del residu que actua com a àcid general en el complex enzim-substrat és de 7.3 [206], s'ha decidit treballar a pH 6.9 i 7.8.

Taula 5.4. Paràmetres d'estat preestacionari per a la hidròlisi del substrat G4G3G-MU amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a pH 6.9 i 7.8. Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, 0.1 mM $CaCl_2$, 30 °C, $[E] = 13.6 \mu M$. Els paràmetres en estat preestacionari s'han obtingut per ajust de l'equació 5.6 a les traces obtingudes mesurant la intensitat de fluorescència amb una longitud d'ona d'excitació de 360 nm i un filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm. Per al càlcul de ΔP en μM , s'ha fet servir el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència de la 4-metilumbel·liferona en dissolució als diferents pH.

pH 6.9			pH 7.8		
[G4G3G-MU] / mM	k_{obs} / s^{-1}	$\Delta P / \mu M$	[G4G3G-MU] / mM	k_{obs} / s^{-1}	$\Delta P / \mu M$
4.85	62 ± 2	1.46	4.70	69 ± 6	0.11
3.23	77 ± 4	1.24	3.13	67 ± 3	0.29
2.43	72 ± 7	0.68	2.35	91 ± 5	0.30
1.62	85 ± 4	0.57	1.57	81 ± 3	0.21
1.21	59 ± 2	0.58	1.18	87 ± 3	0.18
0.61	60 ± 3	0.42	0.59	73 ± 4	0.11
0.30	52 ± 3	0.35	0.20	60 ± 4	0.09

A la taula 5.4 es presenten els valors dels paràmetres cinètics obtinguts en estat preestacionari, per al càlcul de ΔP s'ha fet servir el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència obtingut per a la 4-metilumbel·liferona en dissolució a cada pH. A la taula 5.5 es presenten els resultats d'estat estacionari obtinguts a partir de les traces per ajust de l'equació 5.6.

Taula 5.5. Velocitat d'hidròlisi en estat estacionari del substrat G4G3G-MU catalitzada per la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* a pH 6.9 i 7.8. Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, 0.1 mM CaCl₂, 30 °C, [E] = 13.6 μ M. Els paràmetres en estat estacionari s'han obtingut per ajust de l'equació 5.6 a les traces obtingudes mesurant la intensitat de fluorescència amb una longitud d'ona d'excitació de 360 nm i un filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm. Per al càlcul de la v_{ss} en $M \cdot s^{-1}$, s'ha fet servir el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència de la 4-metilumbel·liferona en dissolució als diferents pH.

pH 6.9		pH 7.8	
[G4G3G-MU] / mM	$10^5 \cdot v_{ss} / M \cdot s^{-1}$	[G4G3G-MU] / mM	$10^5 \cdot v_{ss} / M \cdot s^{-1}$
4.85	0.190	4.70	0.082
3.23	0.218	3.13	0.098
2.43	0.245	2.35	0.099
1.62	0.245	1.57	0.097
1.21	0.231	1.18	0.090
0.61	0.204	0.59	0.076
0.30	0.163	0.20	0.053

Cinètiques amb substrats amb diferent part aglicònica

Per tal d'avaluar l'efecte de variar la part aglicònica del substrat sobre les cinètiques en estat preestacionari es realitzen experiments amb els substrats G4G3G-3,4DNP (**21**) i G4G3G-2,4DNP (**28**). Tots dos són substrats més reactius que el G4G3G-MU (**18**), amb k_{cat} més de 20 i més de 700 vegades superiors a la d'aquest, respectivament. Com ja s'ha esmentat la traça obtinguda determinant les variacions d'absorbància a 400 nm amb aquests substrats és similar a l'obtinguda mesurant la fluorescència de la 4-metilumbel·liferona, amb una fase de retardament d'aproximadament 30 ms de durada, que precedeix una fase d'acumulació de producte. La durada de la fase de retardament és sempre més o menys la mateixa, independentment de la concentració de substrat.

Les k_{obs} obtingudes per ajust de l'equació 5.6 (taula 5.6) a la fase d'acumulació de producte són força independents de la concentració de substrat, i només mostren una tendència creixent amb la concentració d'aquest a baixes concentracions, en què no es pot aplicar l'aproximació d'estat estacionari ($[E] \leq 5-6$ vegades $[S]$). L'amplitud de la fase d'acumulació de producte augmenta amb la concentració de substrat i és altament dependent de la seva reactivitat. Les velocitats d'estat estacionari obtingudes per ajust de l'equació 5.6 a les traces depenen tant de la reactivitat del substrat com de la seva concentració (taula 5.6).

Taula 5.6. Valors dels paràmetres en estat preestacionari i velocitat d'estat estacionari obtinguts per ajust de l'equació 5.6 a les traces obtingudes en la hidròlisi dels substrats G4G3G-3,4DNP (**21**) i G4G3G-2,4DNP (**28**). Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl₂, 30 °C, [E] = 12.3 μM (en la cinètica amb el compost **21**) i [E] = 0.98 μM (en la cinètica amb el compost **28**), es mesura el canvi d'absorbància a 400 nm. Per al càlcul de ΔP en μM i de v_{ss}/[E]₀ en s⁻¹, s'han fet servir les absortivitats dels dos substrats a 400 nm.

G4G3G-3,4DNP (21)				G4G3G-2,4DNP (28)			
[S] / mM	k _{obs} / s ⁻¹	ΔP/[E] ₀	(v _{ss} /[E] ₀) / s ⁻¹	[S] / mM	k _{obs} / s ⁻¹	ΔP/[E] ₀	(v _{ss} /[E] ₀) / s ⁻¹
0.85	67 ± 2	0.36	5.34	2.40	39 ± 2	31.8	213.43
0.56	64 ± 2	0.34	4.59	1.60	41 ± 2	26.6	206.71
0.42	65 ± 2	0.30	3.83	1.20	39 ± 3	19.0	200.58
0.21	55 ± 2	0.25	3.08	0.60	29 ± 3	7.9	180.42
0.11	47 ± 2	0.14	2.51	0.30	33 ± 4	5.1	121.91
0.05	50 ± 3	0.07	1.41	0.15	39 ± 4	1.1	65.56
0.03	32 ± 6	0.04	0.79	0.04	37 ± 4	0.7	11.79

Interpretació dels resultats

Fase de retardament

En els experiments d'unió al mutant inactiu E134A s'ha proposat que en aquesta primera fase es dona una etapa de canvi conformacional lent de l'enzim cap a una forma amb major afinitat per substrat. L'única informació addicional que aporten els experiments amb l'enzim salvatge és que la fase de retardament és independent de l'estructura del substrat, tant per la seva banda glicònica com per l'aglicònica. Aquests resultats concorden amb la proposta de canvi conformacional lent de l'enzim ja que és un procés que no guarda una relació directa amb l'estructura del substrat.

Fase d'acumulació de producte

El primer resultat sorprenent en les cinètiques en estat preestacionari amb l'enzim salvatge de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* és el fet d'observar una fase d'acumulació de producte de reacció. En base als experiments realitzats en estat estacionari amb una família de substrats de diferent reactivitat [208], es conclou que l'etapa determinant de la velocitat de reacció per a la hidròlisi dels mateixos, és l'etapa de glicosidació (capítol 6), i aplicant el mecanisme general per a la hidròlisi de substrats amb retenció de configuració (figura 5.12), no és d'esperar una fase d'acumulació de producte. Segons aquest mecanisme, per a que s'observés una fase d'acumulació de producte, la desglicosidació hauria de ser l'etapa determinant de la velocitat de reacció.



Figura 5.12. Mecanisme general per a la hidròlisi catalitzada per glicosidases que actuen amb retenció de configuració.

Aquests resultats obliguen doncs, a buscar una altra interpretació per a les cinètiques d'acumulació de producte observades en estat preestacionari, començant per trobar una explicació per tal de descartar el model de retenció de configuració en dues etapes.

a) *Per què no pot ser un mecanisme de retenció en dues etapes?*

La definició de la constant de velocitat d'estat preestacionari per al mecanisme de la figura 5.12 és [443]:

$$k_{obs} = \frac{k_2}{1 + \frac{K_S}{[S]}} + k_3 \quad \text{Equació 5.7.}$$

on la $K_S = K_M \cdot (k_3 + k_2) / k_3$. Considerant que perquè s'observi una fase d'acumulació de producte s'ha de complir que la $k_2 > k_3$, llavors $K_S \gg K_M$ i per tant, com s'ha treballat a una concentració de substrat al voltant de K_M , $K_S \gg [S]$. Això permet una simplificació de l'equació de k_{obs} , que pot expressar-se en funció de les constants en estat estacionari ($k_{cat} \approx k_3$) (equació 5.8):

$$k_{obs} \approx \frac{k_{cat}}{K_M} \cdot [S] + k_{cat} \quad \text{Equació 5.8.}$$

De la mateixa manera, l'expressió de l'amplitud de la fase exponencial també pot expressar-se en funció dels paràmetres en estat estacionari (equació 5.9):

$$\Delta P \approx \frac{\alpha_S \cdot [E_0]}{\left[1 + \frac{K_M}{[S]}\right]^2} \quad \text{Equació 5.9.}$$

on α_S és el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència a la concentració de substrat [S], que s'obté a partir de les corbes patró de fluorescència enfront de la concentració de 4-metilumbel·liferona.

La variació de la velocitat en estat estacionari, v_{ss} , en funció de la concentració de substrat, obtinguda per l'ajust de l'equació 5.6 a les traces, permet obtenir els paràmetres d'estat estacionari derivats d'aquestes cinètiques. Aquests paràmetres es poden fer servir per tal d'obtenir una aproximació als valors teòrics dels paràmetres en estat preestacionari corresponents al mecanisme de retenció de configuració, fent servir les equacions 5.8 i 5.9. A la taula 5.7 es recullen els valors de k_{obs} i $\Delta Senyal_P$ obtinguts a partir de l'ajust de l'equació 5.6 a les traces de la reacció de la 1,3-1,4- β -glucanasa amb el substrat G4G3G-MU, i els valors calculats fent servir les equacions 5.8 i 5.9, a partir de les constants k_{cat} i K_M . Els $\Delta Senyal_P$ s'han transformat en concentració molar de producte format (ΔP) emprant el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència.

Taula 5.7. Paràmetres d'estat preestacionari de la hidròlisi del substrat G4G3G-MU amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl₂, 30 °C, [E] = 11.9 μ M. Els valors ajustats de k_{obs} i Δ Senyal_p corresponen als valors obtinguts amb l'ajust de l'equació 5.6 a les traces obtingudes mesurant la intensitat de fluorescència amb una longitud d'ona d'excitació de 360 nm i un filtre d'emissió de longitud d'ona de tall de 455 nm, posteriorment l'amplitud del senyal s'ha convertit en concentració molar de producte format (Δ P) emprant el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència. Els valors calculats s'han obtingut aplicant les equacions 5.8 i 5.9, a partir dels valors dels paràmetres en estat estacionari.

[G4G3G-MU] / mM	Valors ajustats		Valors calculats	
	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	Δ P / μ M	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	Δ P / μ M
4.88	60 ± 4	0.71	2.9	9.79
3.25	58 ± 2	1.03	2.0	8.94
2.45	60 ± 3	0.74	1.6	8.21
1.63	62 ± 2	0.73	1.2	6.96
1.25	63 ± 3	0.67	1.0	6.07
0.63	59 ± 2	0.44	0.7	3.67
0.31	57 ± 3	0.32	0.5	1.76

Una comparació dels valors obtinguts experimentalment amb els valors teòrics fa evident que el mecanisme en dues etapes per a glicosidases que actuen amb retenció de configuració no pot explicar els resultats obtinguts.

b) Dissociació lenta de l'aglicona

S'ha plantejat l'opció que la interacció d'apilament hidrofòbic amb el triptòfan 221 del subseti +1 sigui prou important com per causar una etapa lenta de dissociació de l'aglicona després de la primera etapa d'hidròlisi. En aquest cas l'acumulació de l'espècie EP·X (figura 5.13), en què ja s'hauria hidrolitzat l'enllaç amb l'aglicona però aquesta seguiria unida al centre actiu, seria la responsable del canvi de senyal observat. Donat que segons aquesta hipòtesi s'acumula el primer producte de reacció, l'etapa de glicosidació es presenta com una etapa reversible només en base al principi de microreversibilitat, sense pretendre que la constant de velocitat k_{-1} sigui important.

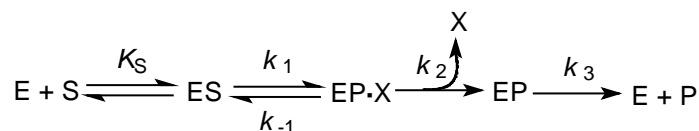


Figura 5.13. Mecanisme d'hidròlisi amb retenció de configuració en què després de l'etapa de glicosidació i abans de la de desglicosidació es produeix una dissociació lenta de l'aglicona.

L'expressió de k_{obs} per a aquest mecanisme es mostra a l'equació 5.10 (equació deduïda a l'apèndix 2). S'observa que per a una k_2 determinant de la velocitat de reacció, i treballant a concentracions de substrat superiors a K_S , la constant de velocitat de l'etapa de glicosidació, k_1 , és la que té un pes major en el valor de k_{obs} .

$$k_{obs} = k_{-1} + k_2 + \frac{k_1}{1 + \frac{K_s}{[S]}}$$
Equació 5.10.

Per tal d'estudiar més a fons aquesta opció s'han realitzat una sèrie de cinètiques a diferents pH al voltant de 7.3, que és el pK_a del residu que actua com a àcid general en el complex enzim-substrat [206]. Si aquest és el model apropiat, s'hauria de veure una disminució de la k_{obs} en augmentar el pH, marcada per la dependència de l'etapa de glicosidació (en aquest mecanisme k_1) amb el pK_a del residu que actua com a àcid general. A la taula 5.4 s'han presentat els valors dels paràmetres cinètics obtinguts en estat preestacionari a pH 6.9 i 7.8. Tot i que la intensitat de fluorescència de la 4-metilumbel·liferona unida al centre actiu de l'enzim pot ser diferent de la seva intensitat de fluorescència en solució, per tal de tenir una aproximació del ΔP s'ha fet servir el factor de proporcionalitat d'intensitat de fluorescència obtingut per a la 4-metilumbel·liferona en solució a cada pH. La manca de dependència de la k_{obs} amb el pH sembla indicar que el senyal en estat preestacionari no es deu a l'acumulació del primer producte de reacció. A més, el fet que els valors de k_{obs} obtinguts fent servir els substrats G4G3G-3,4DNP (**21**) i G4G3G-2,4DNP (**28**) siguin del mateix ordre de magnitud que els obtinguts amb el G4G3G-MU, quan els seus valors de k_{cat} estan molt per sobre del valor de k_{cat} del G4G3G-MU, també indiquen que l'etapa que dona lloc a la fase d'acumulació de producte no és l'etapa de glicosidació.

c) Mecanismes ramificats

Precisament són les cinètiques amb els substrats cromofòrics G4G3G-3,4DNP (**21**) i G4G3G-2,4DNP (**28**) les que han aportat la informació clau per tal de canviar l'enfocament a fi de trobar un mecanisme que expliqui els resultats obtinguts en les cinètiques en estat preestacionari. D'entrada sobta el fet que amb constants de velocitat tan diferents en estat estacionari, el valor de les k_{obs} sigui tan similar per als diferents substrats. Però el que no quadra de cap manera amb un mecanisme lineal és l'amplitud de la fase d'acumulació de producte obtinguda amb el substrat més reactiu (taula 5.6). En un mecanisme lineal l'amplitud de la fase exponencial com a màxim pot ser igual a la concentració de centres actius emprada, ja que el substrat s'uneix al centre actiu de l'enzim de forma estequiomètrica, però mai pot ser superior. L'acumulació de producte que es dona en la fase preestacionària en la hidròlisi del substrat **28** és més de 30 vegades superior a la concentració d'enzim emprada, i donat que la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* només disposa d'un centre actiu, aquest resultat fa palesa l'existència un mecanisme ramificat. En aquests casos, mentre la branca principal ja ha arribat a l'estat estacionari i es van produint diversos cicles catalítics, una de les espècies del cicle principal està en equilibri lent amb un altre complex enzimàtic que està fora del cicle principal [444].

Aquest tipus de mecanisme s'ha proposat freqüentment per tal de descriure la catàlisi de diverses β -lactamases [445-449]. Les β -lactamases catalitzen la hidròlisi de β -lactames amb un mecanisme amb dues etapes catalítiques en què es genera un intermedi acil-enzim, a l'igual que en el cas de les glicosidases que actuen amb retenció de configuració. S'han proposat diferents esquemes per al mecanisme ramificat, però el més comú suposa l'equilibri de l'intermedi de reacció amb una altra forma d'intermedi que reacciona molt més lentament, cas de fer-ho [450] (figura 5.14). Aquesta

inactivació normalment només es veu amb substrats que s'hidrolitzen molt lentament, i a concentracions elevades dels mateixos.

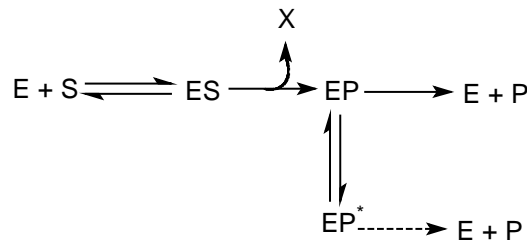
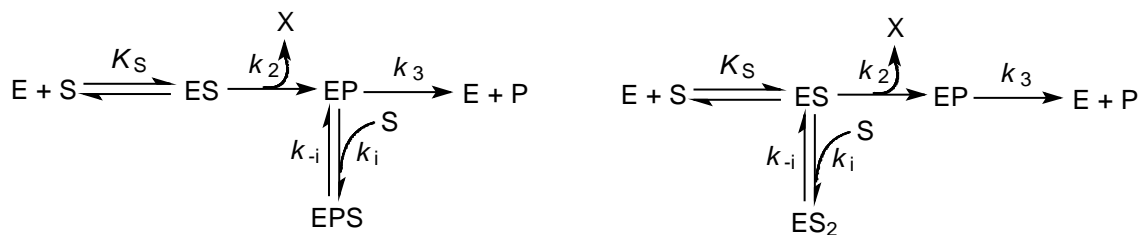


Figura 5.14. Mecanisme ramificat proposat per a la β -lactamasa de *Staphylococcus aureus* PC1 [450].

El fet que a les cinètiques en estat estacionari de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb alguns substrats sintètics s'observi inhibició acompetitiva per substrat [206], ja representa una opció de mecanisme ramificat. Es podria plantejar per tant que l'etapa que dóna lloc a l'acumulació del producte de reacció és l'establiment de l'equilibri en una etapa lenta d'inhibició acompetitiva per substrat, que acaba provocant una disminució de la velocitat fins assolir la velocitat d'estat estacionari (figura 5.15).



$$k_{obs} = \frac{k_i \cdot [S]}{1 + \frac{K_S}{[S]}} + k_{-i}$$

Equació 5.11.

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

Equació 5.12.

Figura 5.15. Possibles mecanismes d'inhibició acompetitiva en un mecanisme de catàlisi en dues etapes, i equacions de k_{obs} associades.

Tot i així, el fet que mentre que les cinètiques en estat preestacionari siguin comparables, independentment del substrat, i que es vegin a totes les concentracions de substrat emprades, mentre que en les cinètiques en estat estacionari no amb tots els substrats s'observa la inhibició, i quan s'observa és a concentracions de substrat molt superiors a la K_M , fa que aquesta opció no sigui generalitzable. A més, per als dos possibles mecanismes amb inhibició acompetitiva, en què es considera que l'etapa lenta és l'establiment de l'equilibri de formació del complex ternari, l'equació de k_{obs} hauria de ser directament dependent de la concentració de substrat, equacions 5.11 i 5.12 (equacions deduïdes a l'apèndix 2), i els resultats obtinguts no mostren aquesta dependència.

La similitud de les traces obtingudes entre el mutant E134A i l'enzim salvatge han fet plantejar l'opció que en els dos casos s'estigui seguint el mateix procés. Així, introduint les etapes catalítiques en el mecanisme deduït per a la unió, s'arriba a un mecanisme similar al d'inhibició, que pot explicar, com a mínim a nivell qualitatiu, una bona part dels resultats (figura 5.16).

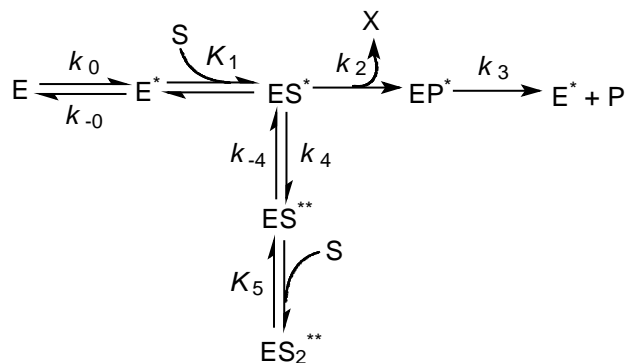


Figura 5.16. Mecanisme plantejat per a la hidròlisi de substrats sintètics per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, que incorpora una etapa de canvi conformacional lent a partir del complex de Michaelis.

Incorporant l'etapa posada de manifest per la fase de retardament, el mecanisme comporta una isomerització lenta de l'enzim per tal de poder unir el substrat formant el complex de Michaelis, a partir del qual es comença a obtenir el producte de reacció. El complex de Michaelis alhora pot experimentar un canvi conformacional lent, que és el que dóna lloc a la fase d'acumulació de producte, i, posteriorment, en aquells substrats en què s'observa inhibició per substrat, unir una segona molècula de substrat per tal de formar un complex ternari. D'acord amb els experiments en estat estacionari (capítol 6) la glicosidació és més lenta que la desglicosidació, per tant la fase d'acumulació només està causada pel canvi conformacional. Es considera que les dues etapes d'unió de substrat són ràpides comparades amb les etapes de canvi conformacional, i que el mecanisme lineal ha assolit l'estat estacionari abans que es doni el segon canvi conformacional. D'aquesta manera, la k_{obs} està governada per la formació d' ES^{**} i ES_2^{**} , i la velocitat de formació de producte, disminueix des d'un valor inicial (en què $[ES^{**} + ES_2^{**}] = 0$), $v_i = k_2 \cdot [ES^*]$, fins a la velocitat d'estat estacionari, $v_{ss} = k_{cat} \cdot [ES^*]$, amb $[ES^{**} + ES_2^{**}] > 0$, on $k_{cat} = k_2 / [1 + K_4]$ i $K_4 = k_4 / k_{-4}$. En aquestes condicions la k_{obs} té la mateixa expressió deduïda per al mecanisme d'unió (equació 5.13, deduïda a l'apèndix 2) per als substrats que presenten inhibició acompetitiva; i per als que no presenten inhibició l'expressió de k_{obs} es recull a l'equació 5.14 (equació deduïda a l'apèndix 2). En els dos casos la k_{obs} és independent de la k_2 , explicant d'aquesta manera la seva manca de dependència tant del pH com de la reactivitat del substrat.

$$k_{obs} = \frac{k_4}{1 + \frac{K_1}{[S]}} + \frac{k_{-4}}{1 + \frac{[S]}{K_5}}$$

Equació 5.13.

$$k_{obs} = \frac{k_4}{1 + \frac{K_1}{[S]}} + k_{-4}$$

Equació 5.14.

En les cinètiques amb l'enzim salvatge, a diferència del que passa amb el mutant inactiu, a les condicions de reacció emprades, la k_{obs} resulta ser essencialment independent de la concentració de substrat. Això només és possible si $[S] \gg K_1$ de manera que pràcticament no hi hagi enzim lliure en el marge de concentracions de substrat emprades, i alhora, la $[S] \gg K_5$ o $[S] \ll K_5$, per als substrats que presenten inhibició.

S'ha treballat a unes concentracions de substrat en el marge de 0.5 a 10 vegades K_M per als diferents substrats, on, per a una glicosidació determinant de la velocitat de reacció, la $K_M = K_1(1+K_0)/(1+K_4)$, la $K_0 = k_{-0}/k_0$, i la $K_4 = k_4/k_{-4}$. Perquè es vegi la fase de retardament, la K_0 ha de ser gran, i si es considera que la constant d'equilibri del segon canvi conformacional, la K_4 , és del mateix ordre de magnitud que s'ha vist en la unió a l'enzim inactiu, $K_4 \approx 0.1$, s'obté una $K_M \gg K_1$, de manera que es compliria el requeriment de $[S] \gg K_1$. En el cas dels substrats que presenten inhibició acompetitiva per substrat, l'expressió de K_M és la mateixa, i un valor de K_5 una mica inferior al que s'ha determinat per a la unió al mutant inactiu ja seria suficient per tal de no observar un decaïment de la k_{obs} amb la concentració de substrat. Ara bé, també és possible que el valor de K_5 sigui superior a la concentració de substrat emprada, seguint la tendència observada per a les constants d'inhibició en estat estacionari, en què es comprova que $K_I = (k_{-i}/k_i) \gg K_M$.

Pel que fa a l'amplitud de la fase d'acumulació de producte, aquesta és proporcional a la concentració d'aglicona alliberada en estat preestacionari, ΔP , que en definitiva és proporcional a la variació de la concentració del complex de Michaelis entre el moment inicial, just després de la fase de retardament, ES_i^* , i la concentració un cop assolit l'estat estacionari, ES_{ss}^* . L'equació 5.15 mostra la dependència de la concentració del complex de Michaelis amb el temps.

$$[ES^*]_{(t)} = [ES_{ss}^*] + \left([ES_i^*] - [ES_{ss}^*] \right) \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t) \quad \text{Equació 5.15.}$$

a partir de la integral d'aquesta expressió s'obté l'amplitud de la fase d'acumulació de producte:

$$\Delta P = k_2 \cdot \Delta ES^* = k_2 \cdot \frac{\left([ES_i^*] - [ES_{ss}^*] \right)}{k_{obs}} \quad \text{Equació 5.16.}$$

Amb aquesta expressió pot explicar-se que l'amplitud de la fase d'acumulació observada amb els diferents substrats sigui proporcional a la seva reactivitat, ja que la constant de velocitat de l'etapa de glicosidació, k_2 , que és altament dependent de la reactivitat del substrat, està directament lligada a la formació del producte.

d) *Avaluació dels paràmetres cinètics obtinguts a partir de la velocitat inicial d'hidròlisi*

A més dels paràmetres típics que defineixen les cinètiques en estat preestacionari, k_{obs} i ΔP , a partir de les traces de l'enzim salvatge amb els diferents substrats s'ha obtingut també la v_i , que representa la velocitat inicial de la fase preestacionària (després de la fase de retardament). Aquesta velocitat, determinada a partir de l'equació 5.17, mostra una dependència hiperbòlica amb la concentració de substrat (es mostra un exemple a la figura 5.17), que permet fer l'assumpció que s'arriba a un primer estat estacionari abans que es doni el procés que genera la fase d'acumulació de producte. Aquesta assumpció permet deduir l'equació de velocitat associada a aquest primer estat estacionari i avaluar-ne els paràmetres cinètics k_{cat} i k_{cat}/K_M inicials (taula 5.8). En el cas del substrat més activat, a partir dels resultats obtinguts, només es pot obtenir el límit inferior per al valor de k_{cat} inicial. A continuació la comparació dels paràmetres cinètics inicials i els de l'estat estacionari final (després de la fase d'acumulació de producte), obtinguts a partir de v_{ss} , aporta més informació mecanística.

$$v_i = k_{cat,i} \cdot [ES_0^*] = k_{obs} \cdot \Delta P + v_{ss} \quad \text{Equació 5.17.}$$

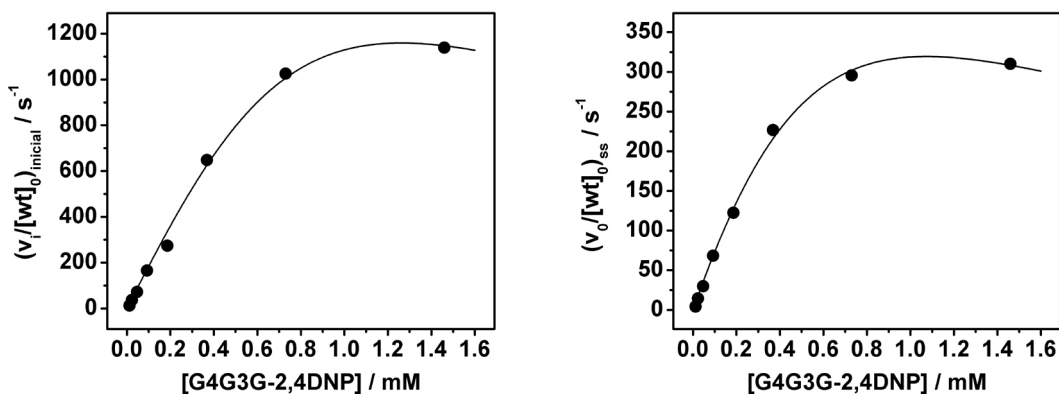


Figura 5.17. Dependència de les velocitats d'hidròlisi inicial i d'estat estacionari obtingudes en les cinètiques de flux interromput amb la concentració de substrat per al G4G3G-2,4DNP. Condicions experimentals: tampó 87 mM fofat, 6.5 mM citrat, pH 7.2, 0.1 mM CaCl₂, 30 °C, [wt] = 1.1 μM.

A partir dels valors obtinguts en l'ajust de l'equació de Michaelis amb o sense inhibició acompetitiva per substrat, que es mostren a la taula 5.8, es comprova que tant la k_{cat} com la constant de velocitat de segon ordre en condicions inicials són superiors a les d'estat estacionari per a tots els substrats.

Taula 5.8. Valors de k_{cat} i k_{cat}/K_M obtinguts en la hidròlisi dels substrats sintètics. Els paràmetres inicials s'han obtingut a partir dels valors de v_i calculats a partir de l'equació 5.17, els paràmetres d'estat estacionari s'han obtingut a partir dels valors de v_{ss} obtinguts per ajust de l'equació 5.6 a les traces. Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6,5 mM citrat, pH 7.2, 0,1 mM CaCl_2 , 30 °C, i en cada cas la concentració d'enzim necessària per tal de poder seguir les cinètiques ($[\text{E}] = 11.9 \mu\text{M}$ (**18**); $[\text{E}] = 12.3 \mu\text{M}$ (**21**); $[\text{E}] = 0.98 \mu\text{M}$ (**28**); $[\text{E}] = 8.9 \mu\text{M}$ (**23** i **70**)).

Compost	Paràmetres inicials		Paràmetres en estat estacionari	
	$(k_{cat}/K_M) / \text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{cat} / s^{-1}	$(k_{cat}/K_M) / \text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{cat} / s^{-1}
G4G3G-MU (18)	6.5 ± 0.4	8 ± 2	0.46 ± 0.05	0.49 ± 0.05
G4G3G-3,4DNP (21)	100 ± 6	43 ± 3	11 ± 0.5	7.8 ± 1.4
G4G3G-2,4DNP (28)	1120 ± 100	> 2000	500 ± 80	400 ± 100
G4G4G3G-MU (23)	5.8 ± 0.3	4.0 ± 0.5	0.80 ± 0.05	0.39 ± 0.03
G4G4G4G3G-MU (70)	6.1 ± 0.3	3.8 ± 0.3	0.83 ± 0.07	0.50 ± 0.09

A la figura 5.18 es mostra el mecanisme proposat a partir dels paràmetres k_{obs} i ΔP , en què es mostren en color blau les etapes que haurien assolit l'estat estacionari inicial (previ a la fase d'acumulació), que permeten deduir les expressions de k_{cat} i k_{cat}/K_M inicials.

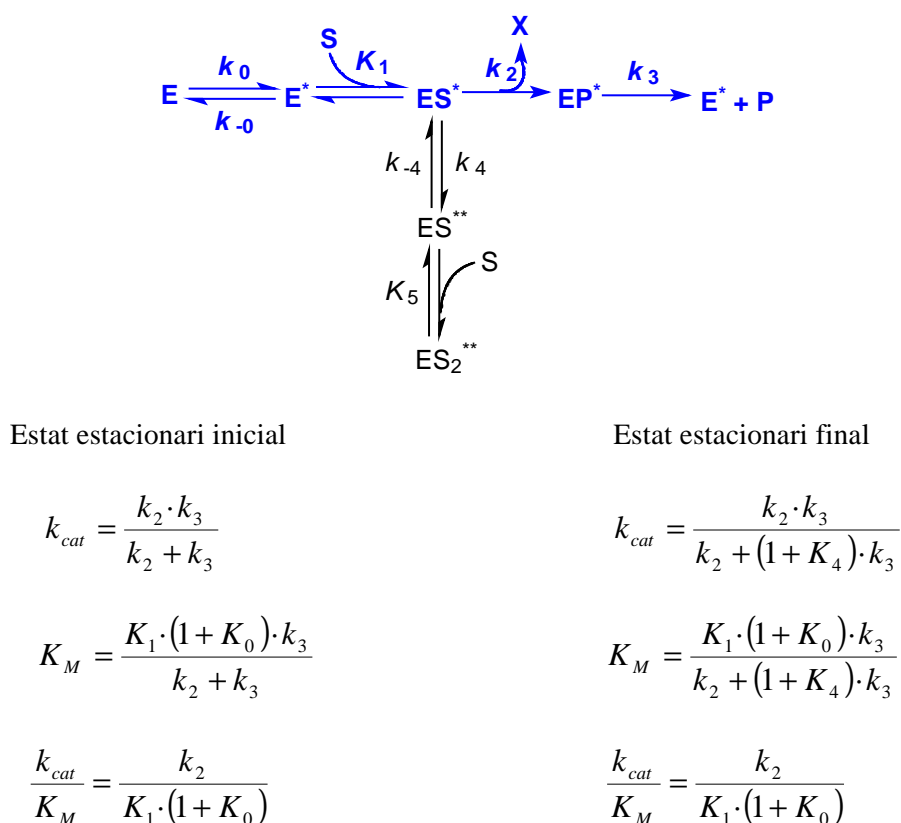
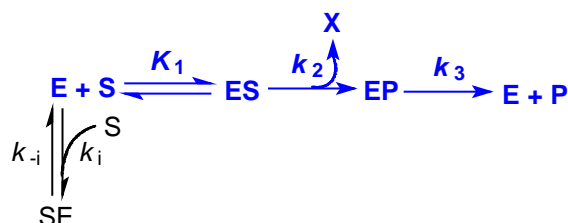


Figura 5.18. Mecanisme plantejat per a la hidròlisi de substrats sintètics per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, en què s'indica en color blau el mecanisme que hauria assolit l'estat estacionari inicial, abans de l'etapa d'acumulació de producte associada al canvi conformacional lent a partir del complex de Michaelis. Es presenten també les equacions dels paràmetres cinètics k_{cat} , K_M i k_{cat}/K_M inicials i les corresponents a l'estat estacionari final.

Els resultats presentats a la taula 5.8 no són compatibles amb el mecanisme proposat, en què els paràmetres k_{cat} i K_M es veuen afectats per igual per les etapes que conformen el mecanisme ramificat, de manera que el valor de la k_{cat}/K_M abans i després del canvi conformacional és el mateix (figura 5.18). S'ha de buscar doncs un model diferent per tal d'explicar els resultats obtinguts.

Per tal d'explicar la diferència entre els valors inicial i final de la constant de velocitat de segon ordre, a l'etapa d'acumulació de producte s'ha de donar la formació d'espècies enzimàtiques que no tinguin el substrat unit productivament. L'opció més senzilla és la inhibició competitiva pel propi substrat, per un mal posicionament del mateix que no el fes apte per a la hidròlisi. En aquest mecanisme l'etapa lenta seria la de formació del complex no productiu, SE, amb una $k_i \ll k_{-i}$. Ara bé, aquest mecanisme (figura 5.19), també s'ha de descartar, perquè rendiria constants de velocitat de segon ordre iguals abans i després de l'establiment de l'equilibri de l'etapa d'inhibició.



Estat estacionari inicial

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

$$K_M = \frac{K_1 \cdot k_3}{k_2 + k_3}$$

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_2}{K_1}$$

Estat estacionari final

$$k_{cat} = \frac{k_2 \cdot k_3 \cdot K_I}{K_1 \cdot k_3 + K_I \cdot (k_2 + k_3)}$$

$$K_M = \frac{K_1 \cdot K_I \cdot k_3}{K_1 \cdot k_3 + K_I \cdot (k_2 + k_3)}$$

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_2}{K_1}$$

Figura 5.19. Mecanisme plantejat per a la hidròlisi de substrats sintètics per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, que incorpora una etapa d'inhibició competitiva per substrat, que és l'etapa lenta que genera les cinètiques en estat preestacionari. Es marca en color blau el mecanisme que hauria assolit l'estat estacionari inicial, anterior a la fase d'acumulació de producte. Es presenten també les equacions dels paràmetres cinètics k_{cat} , K_M i k_{cat}/K_M inicials i les corresponents a l'estat estacionari final.

Pel mateix motiu també s'han de descartar mecanismes mixtes en què s'incorpora una etapa d'inhibició competitiva per substrat al mecanisme que incorpora el canvi conformacional amb inhibició acompetitiva (figura 5.20). Independentment de si l'etapa lenta és la que genera el complex no productiu SE, el canvi conformacional a partir del complex ES o EP, o bé totes dues, l'expressió de k_{cat}/K_M inicial i final és k_2/K_1 .

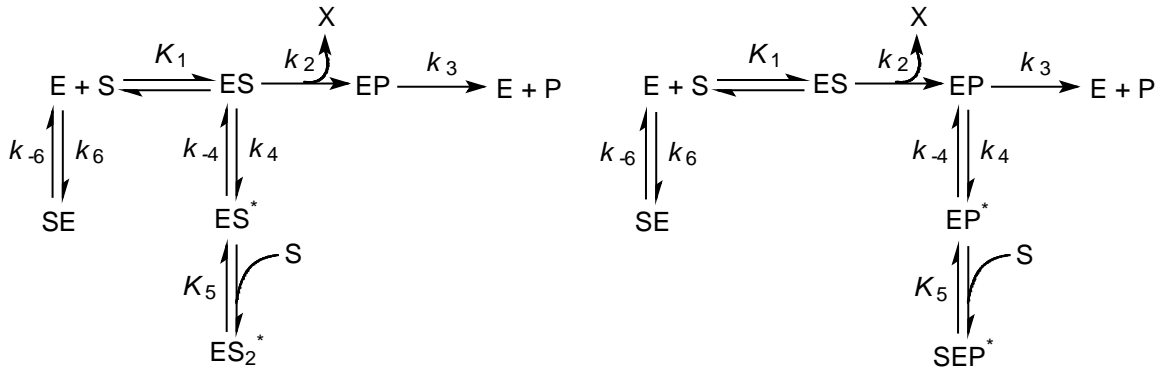


Figura 5.20. Mecanismes plantejats per a la hidròlisi de substrats sintètics per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, que incorporen una etapa d'inhibició competitiva per substrat, apart de l'etapa de canvi conformacional amb unió d'una segona molècula de substrat sobre el complex de Michaelis (esquerra), o sobre l'intermedi covalent (dreta).

Una altra opció suposa l'existència d'una conformació d'enzim lliure, E^* , igual a la que adopta l'enzim en el complex ES^* (figura 5.21). L'inconvenient que presenta aquest model és que el més possible és que les dues formes enzimàtiques ja s'haguessin equilibrat abans de la barreja o durant la fase de retardament, de forma que el complex ES^* es formaria de manera immediata en la barreja i simultàniament es donaria l'equilibri entre ES i ES^* , com a resultat no s'observaria la fase d'acumulació de producte en estat preestacionari. El model que es proposi ha d'incorporar, per tant, un canvi com a resposta a la presència del substrat en el medi de reacció.

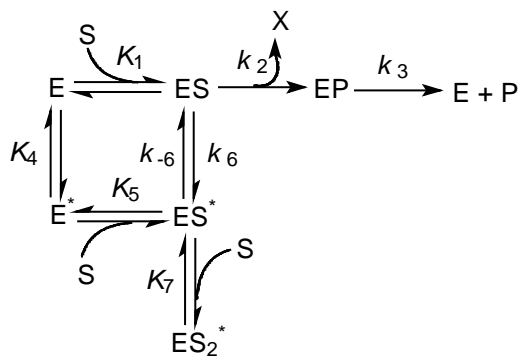


Figura 5.21. Mecanisme plantejat per a la hidròlisi de substrats sintètics per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, que inclou l'existència de l'enzim lliure en dues conformacions diferents E i E^* que es corresponen amb les conformacions adoptades per l'enzim en els complexos ES i ES^* , respectivament.

La manca d'èxit amb mecanismes relativament senzills porta a plantejar un mecanisme força més complex però que és capaç d'explicar els resultats observats (figura 5.22). Segons aquest mecanisme, la 1,3-1,4- β -glucanasa tindria un seti regulador de l'activitat enzimàtica que se satura a baixa concentració de substrat, amb una unió no-productiva forta (formació del complex SE^*). Aquesta unió, que és necessària perquè es formi el complex productiu, SES^* , es dona junt amb la unió del substrat al centre actiu en la fase

de retardament. Per a que la fase de retardament vingui determinada pel canvi conformacional previ de l'enzim, les dues etapes d'unió han de ser ràpides. A continuació les dues espècies SE^* i SES^* experimenten un canvi conformacional lent governat per la k_{obs} de la fase d'acumulació, en què es transformen en les espècies SE^{**} (no productiva) i SES^{**} (que és inactiva o menys activa que SES^*), respectivament. El que s'aconsegueix amb la introducció de l'etapa d'unió de substrat a un seti regulador és que les dues conformacions enzimàtiques que es troben en equilibri no hagin assolit aquest equilibri prèviament a la presència de substrat al medi de reacció. Per als substrats que, a més, presenten inhibició acompetitiva per substrat hi ha una darrera etapa de formació del complex quaternari. Aquesta inhibició es pot donar tant sobre el complex ternari SES^* (formant el complex SES_2^{**}) com sobre l'intermedi de reacció SEP^* (formant el complex $SEPS^*$), i donat que ja s'observa a les cinètiques inicials, anteriors al canvi conformacional, és molt possible que com a mínim es formi el complex quaternari $SEPS^*$. Tot i així, no es descarta que també pugui formar-se el complex SES_2^{**} .

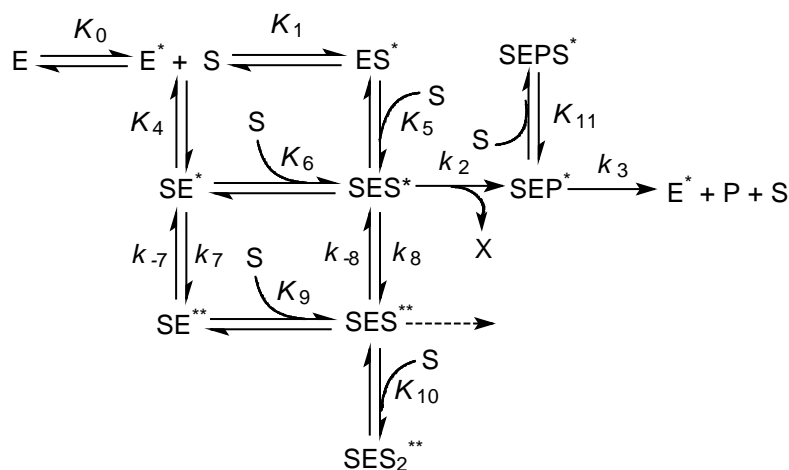


Figura 5.22. Mecanisme proposat per a la hidròlisi de substrats sintètics per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, que inclou la unió a un seti regulador de l'activitat enzimàtica necessària per a la formació del complex productiu, i posterior canvi conformacional.

En base a aquest model, a la figura 5.23 es mostra el mecanisme que es proposa que hagi assolit l'estat estacionari inicial, previ a l'acumulació de producte de reacció, a partir del qual s'obté l'equació de la velocitat inicial (equació 5.18). Tant en la deducció de les equacions de velocitat inicial (v_i) com de velocitat en estat estacionari final (v_{ss}) s'han obviat les etapes d'inhibició acompetitiva per substrat.

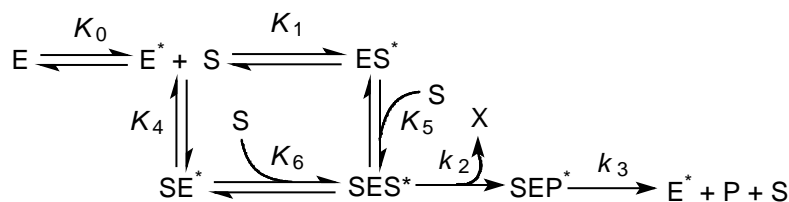


Figura 5.23. Mecanisme que es proposa que hagi assolit un primer estat estacionari anterior a l'acumulació de producte de reacció, que es dona com a conseqüència de les etapes lentes de canvi conformacional K_7 i K_8 del mecanisme de la figura 5.22.

Així doncs, l'equació de velocitat inicial és:

$$v_i = \frac{k_2 \cdot [E_0]}{1 + \frac{K_6}{[S]} \cdot \left[1 + \frac{K_4}{[S]} \cdot (1 + K_0) \right]} \quad \text{Equació 5.18.}$$

on $K_0 = [E]/[E^*]$, i $k_{\text{cat}} = k_2$.

Suposant que la unió al seti regulador és molt més forta que la unió al centre actiu ($K_4, K_5 \ll K_1, K_6$) i que, per tant, s'ha treballat a una $[S] \gg K_4$, l'equació 5.18 se simplifica en l'equació 5.19:

$$v_i \approx \frac{k_2 \cdot [E_0]}{1 + \frac{K_6}{[S]}} \quad \text{Equació 5.19.}$$

Un cop assolit l'estat estacionari final, l'equació de velocitat del mecanisme sencer fent les mateixes suposicions que en la deducció de la velocitat inicial (i sense tenir en compte la inhibició acompetitiva) és:

$$v_{ss} \approx \frac{\frac{k_2}{1 + K_8} \cdot [E_0]}{1 + \frac{K_6 \cdot (1 + K_7)}{[S] \cdot (1 + K_8)}} \quad \text{Equació 5.20.}$$

de manera que:

$$k_{\text{cat},i} = k_{\text{cat},ss} \cdot (1 + K_8) \quad \text{i} \quad (k_{\text{cat}} / K_M)_i = (k_{\text{cat}} / K_M)_{ss} \cdot (1 + K_7)$$

Equació 5.21.

Equació 5.22.

A la taula 5.9 es presenten els valors obtinguts per a K_7 i K_8 aplicant les equacions 5.21 i 5.22 als valors de la taula 5.8. Els valors de K_8 són menys exactes que els de K_7 , ja que amb els resultats obtinguts no s'ha pogut determinar amb precisió l'efecte de la inhibició acompetitiva, que afecta el valor de k_{cat} però no afecta el valor de k_{cat}/K_M . Tot i així, els valors de les dues constants d'equilibri són força semblants, i s'observa una certa tendència de la K_7 amb la reactivitat del substrat, de manera que com menys reactiu és el substrat més gran és la constant d'equilibri del canvi conformacional. Aquest resultat és coherent amb un mecanisme en què la constant d'equilibri de formació del complex productiu és similar per als diferents substrats, ja que, en aquest

cas, com menys reactiu és el substrat més gran és la concentració dels complexos SE^* i SES^* , i més importància pren la segona branca.

Taula 5.9. Valors per a les constants de canvi conformacional K_7 i K_8 corresponents al mecanisme de la figura 5.22, calculats a partir dels paràmetres cinètics dels estats estacionaris inicial (anterior als canvis conformacionals) i final, aplicant les equacions 5.21 i 5.22. Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, pH 7.2, 0.1 mM $CaCl_2$, 30 °C, i en cada cas la concentració d'enzim necessària per tal de poder seguir les cinètiques ($[E] = 11.9 \mu M$ (**18**); $[E] = 12.3 \mu M$ (**21**); $[E] = 0.98 \mu M$ (**28**); $[E] = 8.9 \mu M$ (**23** i **70**)).

Substrat	K_7	K_8
G4G3G-MU (18)	13	15
G4G3G-3,4DNP (21)	8	5
G4G3G-2,4DNP (28)	1	---
G4G4G3G-MU (23)	6	9
G4G4G4G3G-MU (70)	6	7

Pel que fa a l'equació de la k_{obs} associada a aquest mecanisme, s'han realitzat una sèrie d'assumpcions per tal de simplificar-ne la deducció (veure apèndix 2). D'una banda, i donat que no és un tret que s'observi per igual per a tots els substrats, s'ha obviat la inhibició acompetitiva. D'altra banda, s'ha tornat a considerar que l'afinitat del seti regulador per substrat és superior a la del centre actiu, i per qüestions matemàtiques, que $k_{-7} \approx k_{-8}$. Finalment l'expressió deduïda per a la k_{obs} és:

$$k_{obs} = \frac{k_7 + k_{-7}}{1 + \frac{[S]}{K_6}} + \frac{k_8 + k_{-8}}{1 + \frac{K_6}{[S]}} \quad \text{Equació 5.23.}$$

Segons aquesta equació la k_{obs} és relativament independent de la concentració de substrat si $K_7 \approx K_8$, ja que a baixes concentracions de substrat el primer terme de l'equació 5.23 és el que pren més importància amb una $k_{obs} \approx k_7 + k_{-7}$, i a concentracions de substrat elevades, el terme de més pes passa a ser el segon terme del sumatori i la $k_{obs} \approx k_8 + k_{-8}$. Els valors calculats de les dues constants de canvi conformacional per als diferents substrats són bastant semblants (taula 5.9), de manera que amb aquesta equació podrien explicar-se els resultats obtinguts en les cinètiques de flux interromput.

5.2.3. Dependència de les cinètiques en estat preestacionari amb el pH

S'ha avaluat la influència del pH en la hidròlisi del compost G4G3G-3,4DNP realitzant les cinètiques a 5 pH diferents per sobre del pK_a del fenol lliure ($pK_{a, 3,4\text{-dinitrofenol}} = 5.36$), amb la finalitat que el senyal corresponent a l'aglicona alliberada sigui suficient per tal de poder detectar la fase d'acumulació de producte. Els resultats obtinguts es presenten a les taules 5.10, 5.11 i 5.12.

Taula 5.10. Dependència de la k_{obs} amb el pH en la hidròlisi del G4G3G-3,4DNP amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, 0.1 mM CaCl_2 , 30 °C, la concentració d'enzim emprada a cada pH s'indica a la taula. El valor de la k_{obs} s'ha obtingut per ajust de l'equació 5.6 a les traces obtingudes mesurant l'absorbància a 400 nm.

pH 6.23 [wt] = 2.66 μM		pH 6.76 [wt] = 2.78 μM		pH 7.18 [wt] = 12.3 μM	
[S] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	[S] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	[S] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
0.925	46 ± 3	1.015	61 ± 7	0.845	67 ± 2
0.617	51 ± 3	0.677	65 ± 4	0.565	64 ± 2
0.463	46 ± 3	0.508	65 ± 2	0.423	65 ± 2
0.308	50 ± 3	0.338	63 ± 2	0.212	55 ± 2
0.231	46 ± 2	0.254	66 ± 3	0.106	47 ± 2
0.116	42 ± 2	0.127	63 ± 5	0.053	50 ± 3
0.058	25 ± 3	0.063	63 ± 17	0.027	32 ± 6
0.029	17 ± 2	0.032	60 ± 15		

pH 7.8 [wt] = 11.7 μM		pH 8.25 [wt] = 11.4 μM	
[S] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	[S] / mM	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
0.900	62 ± 2	1.000	85 ± 5
0.600	50 ± 1	0.750	68 ± 2
0.450	66 ± 2	0.500	69 ± 5
0.225	44 ± 3	0.375	71 ± 3
0.113	53 ± 10	0.188	56 ± 5
0.057	46 ± 3	0.092	53 ± 8
0.029	55 ± 10		

Es comprova que la k_{obs} no segueix una tendència clara amb el pH i es podria dir que en la majoria dels casos els valors se situen en el marge de 60 ± 20 . D'altra banda, a pH 6.23 i, d'una forma una mica menys significativa, a pH 8.25 sembla que a baixes concentracions de substrat la k_{obs} augmenta en augmentar la concentració de substrat.

Pel que fa a l'amplitud de la fase exponencial es comprova que és proporcional a l'activitat enzimàtica, augmentant amb la concentració de substrat i dins del marge de pH estudiat, disminuint en augmentar el pH (taula 5.11).

Taula 5.11. Dependència de l'amplitud de la fase d'acumulació de producte amb el pH en la hidròlisi del G4G3G-3,4DNP amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, 0.1 mM CaCl₂, 30 °C, la concentració d'enzim emprada a cada pH s'indica a la taula. L'amplitud de la fase d'acumulació de producte s'ha obtingut per ajust de l'equació 5.6 a les traces obtingudes mesurant l'absorbància a 400 nm, i posteriorment s'ha convertit a concentració de producte alliberat fent servir l'absortivitat del 3,4DNP a cada pH.

pH 6.23 [wt] = 2.66 μ M		pH 6.76 [wt] = 2.78 μ M		pH 7.18 [wt] = 12.3 μ M	
[S] / mM	$\Delta P/[wt]_0$	[S] / mM	$\Delta P/[wt]_0$	[S] / mM	$\Delta P/[wt]_0$
0.925	1.15	1.015	0.65	0.845	0.36
0.617	0.82	0.677	0.68	0.565	0.34
0.463	0.68	0.508	0.67	0.423	0.30
0.308	0.54	0.338	0.59	0.212	0.25
0.231	0.48	0.254	0.47	0.106	0.14
0.116	0.29	0.127	0.32	0.053	0.07
0.058	0.17	0.063	0.20	0.027	0.04
0.029	0.07	0.032	0.10		

pH 7.8 [wt] = 11.7 μ M		pH 8.25 [wt] = 11.4 μ M	
[S] / mM	$\Delta P/[wt]_0$	[S] / mM	$\Delta P/[wt]_0$
0.900	0.23	1.000	0.19
0.600	0.28	0.750	0.16
0.450	0.22	0.500	0.13
0.225	0.14	0.375	0.12
0.113	0.07	0.188	0.07
0.057	0.04	0.092	0.04
0.029	0.03		

En quant a la velocitat d'estat estacionari assolida un cop finalitzada la fase exponencial, es comprova que aquesta és dependent tant de la concentració de substrat com del pH amb un màxim al voltant de pH 6.5 i disminuint en augmentar el pH (taula 5.12).

Taula 5.12. Dependència de la velocitat d'estat estacionari final (v_{ss}) amb el pH en la hidròlisi del G4G3G-3,4DNP amb la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, 0.1 mM CaCl_2 , 30 °C, la concentració d'enzim emprada a cada pH s'indica a la taula. Per al càlcul de la $v_{ss}/[E]_0$ en s^{-1} , s'ha fet servir l'absortivitat del 3,4DNP a 400 nm als diferents pH.

pH 6.23 [wt] = 2.66 μM		pH 6.76 [wt] = 2.78 μM		pH 7.18 [wt] = 12.3 μM	
[S] / mM	$(v_{ss}/[\text{wt}]_0) / \text{s}^{-1}$	[S] / mM	$(v_{ss}/[\text{wt}]_0) / \text{s}^{-1}$	[S] / mM	$(v_{ss}/[\text{wt}]_0) / \text{s}^{-1}$
0.925	5.341	1.015	4.663	0.845	2.840
0.617	4.587	0.677	4.556	0.565	2.956
0.463	3.826	0.508	3.981	0.423	2.416
0.308	3.079	0.338	3.387	0.212	1.788
0.231	2.506	0.254	2.665	0.106	0.916
0.116	1.410	0.127	1.804	0.053	0.470
0.058	0.789	0.063	1.022	0.027	0.231
0.029	0.356	0.032	0.561		

pH 7.8 [wt] = 11.7 μM		pH 8.25 [wt] = 11.4 μM	
[S] / mM	$(v_{ss}/[\text{wt}]_0) / \text{s}^{-1}$	[S] / mM	$(v_{ss}/[\text{wt}]_0) / \text{s}^{-1}$
0.900	----	1.000	1.153
0.600	1.463	0.750	0.946
0.450	1.194	0.500	0.759
0.225	0.765	0.375	0.575
0.113	0.378	0.188	0.376
0.057	0.210	0.092	0.191
0.029	0.106		

Finalment es pot dir que la relació del paràmetre $(k_{cat}/K_M)_{\text{inicial}}/(k_{cat}/K_M)_{\text{ss}}$ és relativament constant (taula 5.13), cosa que indica que dins del marge de pH estudiat, el canvi conformacional del complex no productiu, $\text{SE}^* \leftrightarrow \text{SE}^{**}$, és relativament independent del pH, i en el cas del substrat G4G3G-3,4DNP, la K_7 pren un valor proper a 9. Es comprova que el $\text{p}K_a$ obtingut després del canvi conformacional és 0.3 unitats de pH inferior a l'obtingut a partir dels valors inicials (figura 5.24), la qual cosa indica que el canvi conformacional situa el residu que actua com a àcid general en un microentorn lleugerament més hidrofílic.

Taula 5.13. Valors de k_{cat}/K_M i K_7 obtinguts en la hidròlisi del G4G3G-3,4DNP a diferents pH per part de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Els paràmetres inicials s'han obtingut a partir dels valors de v_i calculats aplicant l'equació 5.17, i els paràmetres d'estat estacionari s'han obtingut a partir de la velocitat ajustada a la part lineal de les traces aplicant l'equació 5.6. Els valors de K_7 s'han obtingut aplicant l'equació 5.22. Condicions experimentals: tampó 87 mM fosfat, 6.5 mM citrat, 0.1 mM CaCl_2 , 30 °C, les concentracions d'enzim i substrat a cada pH són les indicades a les taules 5.10, 5.11 i 5.12.

pH	$(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{inicial}} / \text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{ss}} / \text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	K_7
6.23	130 ± 28	15 ± 1	8
6.76	199 ± 94	17 ± 2	11
7.20	100 ± 6	11 ± 0.5	8
7.80	39 ± 18	4.1 ± 0.9	9
8.25	21 ± 12	2.2 ± 0.6	9

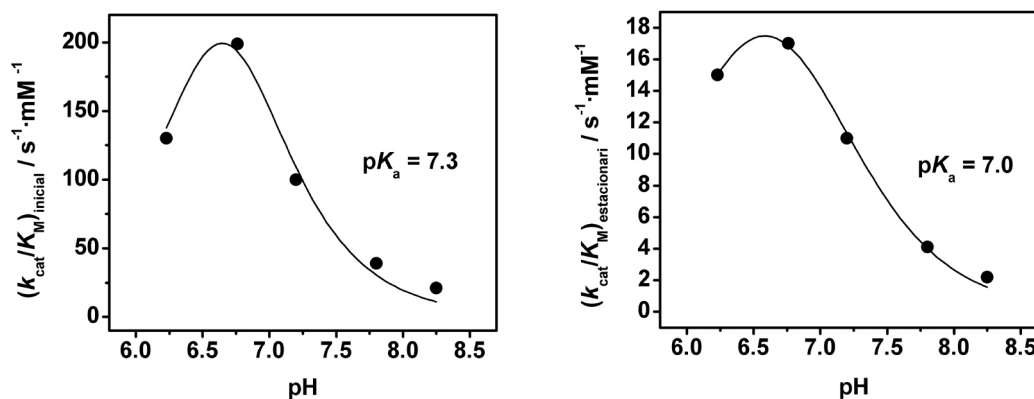
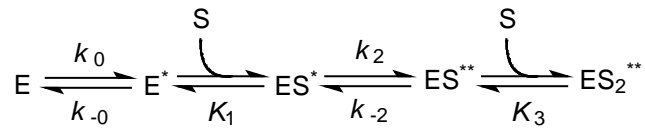


Figura 5.24. Dependència dels valors de $(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{inicial}}$ i de $(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{estacionari}}$ de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb el pH, obtinguts a partir de les cinètiques de flux interromput.

5.3. Conclusions

➤ Les diferents cinètiques en estat preestacionari de l'enzim salvatge i el mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb aril β -glicòsids presenten un aspecte molt similar, i els resultats obtinguts a partir dels paràmetres que les caracteritzen apunten a un comportament semblant a nivell d'unió de lligands. La traça es caracteritza per una fase de retardament d'una durada aproximada de 30 ms, seguida d'un decaïment monoexponencial del senyal, que en el cas de l'enzim salvatge acaba assolint la velocitat d'estat estacionari.

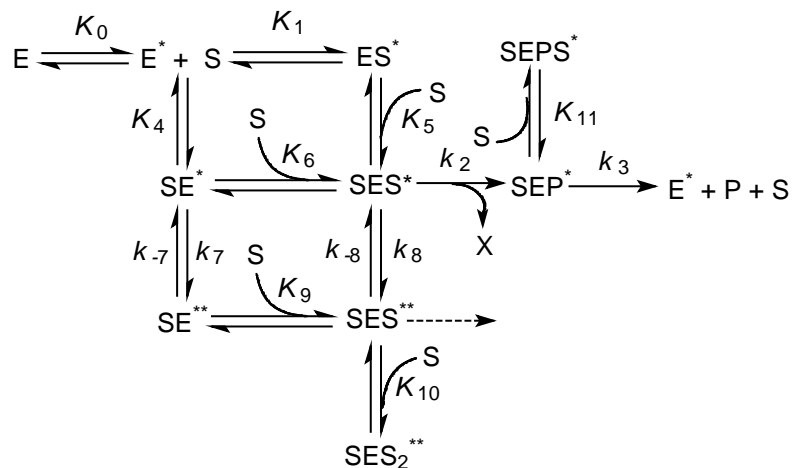
➤ El mecanisme més senzill que permet explicar la unió del G4G3G-MU al mutant inactiu E134A de la 1,3-1,4- β -glucanasa comporta l'alternança de dues etapes de canvi conformacional amb dues etapes d'unió de substrat :



Aquest mecanisme implica el desplaçament d'un equilibri prèviament existent entre les poblacions de dues conformacions enzimàtiques, com a resposta a la unió del substrat al centre actiu per tal de formar el complex productiu; aquest, al seu torn està sotmès a un canvi conformacional que comporta la unió d'una segona molècula de substrat. Perquè aquesta primera etapa d'equilibri entre les dues conformacions enzimàtiques es faci evident a les cinètiques la conformació E ha de ser molt més estable que la conformació E*, però ha de ser incapaç d'unir substrat, de forma que el que es mesura a l'etapa de retardament sigui l'establiment d'un nou equilibri poblacional induït per la presència del substrat.

➤ La magnitud de la fase d'acumulació en les cinètiques de l'enzim salvatge amb el substrat G4G3G-2,4DNP permet descartar que la 1,3-1,4- β -glucanasa catalitzi la hidròlisi de glicòsids a través del mecanisme bàsic de retenció de configuració. A més, la manca de dependència del valor de la k_{obs} enfront de la reactivitat del substrat o de les condicions de reacció (diferents pH) indica que l'etapa lenta causant de la fase d'acumulació no és cap de les etapes catalítiques.

➤ Els diferents resultats obtinguts en les cinètiques en estat preestacionari amb l'enzim salvatge permeten proposar el següent mecanisme d'hidròlisi per a la 1,3-1,4- β -glucanasa:



Segons aquest mecanisme, la 1,3-1,4- β -glucanasa tindria un seti regulador de l'activitat enzimàtica que se satura a baixa concentració de substrat, amb una unió no-productiva forta (formació del complex SE*). Aquesta unió, que és necessària perquè es formi el complex productiu, SES*, es dona junt amb la unió del substrat al centre actiu en la fase de retardament. Perquè la fase de retardament vingui determinada pel canvi

conformacional previ de l'enzim, les dues etapes d'unió han de ser ràpides. A continuació les dues espècies SE^* i SES^* experimenten un canvi conformacional lent governat per la k_{obs} de la fase d'acumulació, en què es transformen en les espècies SE^{**} (no productiva) i SES^{**} (que és inactiva o menys activa que SES^*), respectivament. Per als substrats que, a més, presenten inhibició acompetitiva per substrat hi ha una darrera etapa de formació del complex quaternari. Aquesta inhibició es pot donar tant sobre el complex ternari SES^{**} (formant el complex SES_2^{**}) com sobre l'intermedi de reacció SEP^* (formant el complex $SEPS^*$).

➤ El canvi conformacional del complex SE^* comporta una petita variació en el valor de pK_a que s'assigna al residu que actua d'àcid/base general (el Glu138), que indica que com a resultat del canvi conformacional aquest residu es troba en un entorn lleugerament més hidrofílic.