



Universitat de Barcelona

Facultat de Química

Departament de Química Física

i

Parc Científic de Barcelona

Centre especial de Recerca en Química Teòrica

**MECANISMES DE Preactivació de
SUBSTRAT EN 1,3-1,4- β -GLUCANASA**
MODELITZACIÓ MITJANÇANT DINÀMICA MOLECULAR
DE PRIMERS PRINCIPIS

Memòria presentada per XEVI BIARNÉS FONTAL
per tal d'optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona.
Programa de doctorat de Biotecnologia (bienni 2003-2005).

Aquesta tesi ha estat realitzada al Parc Científic de Barcelona, sota la direcció
de la Dra. Carme Rovira i Virgili, Professora d'Investigació ICREA,
comptant amb la tutoria del Dr. Fausto Sanz Carrasco, Catedràtic del Departament de
Química Física de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, setembre de 2007

capítol I

Introducció

I.1. Les Glicosil Hidrolases

Les glicosil hidrolases (GHs) catalitzen la hidròlisi d'enllaços glicosídics entre dues unitats de carbohidrat en polisacàrids en general o entre un unitat de carbohidrat i una unitat aglicònica (com ara adenina, guanina, timina, citosina en les bases nitrogenades del DNA i RNA). Són enzims molt comuns involucrats en diferents processos biològics com ara en la degradació de biomassa com cel·lulosa i midó, en diferents estratègies antibacterianes (lisosima), en mecanismes patogènics (neuroaminidases víriques) i en funcions de marcatge cel·lular (manosidases involucrades en el postmarcatge de glicoproteïnes). Conjuntament amb les glicosiltransferases, les GH formen la major part de la maquinària enzimàtica per a la síntesi i degradació d'enllaços glicosídics.

Degut a l'enorme diversitat funcional i estructural d'oligosacàrids i polisacàrids presents en la natura, existeix una gran diversitat de GHs amb funcions específiques segons el tipus de substrat. Les GHs s'acostumen a anomenar atenent al substrat sobre el que actuen. Així, les glucosidases catalitzen la hidròlisi de glucòsids i les xilanases catalitzen la degradació del xilà (homopolímer basat en unitats de xilosa). Altres exemples inclouen la lacatasa, amilasa, quitinasa, sucrasa, maltasa, manosidasa, neuraminidasa, o la lisosima.

Les GHs tenen una ampla varietat d'aplicacions que inclouen la degradació de materials vegetals (per exemple les cel·lulases s'utilitzen per degradar la cel·lulosa a glucosa, la qual pot ser utilitzada en la producció d'etanol), en la indústria alimentària, en la indústria del paper (les xilanases són emprades per degradar les cadenes de hemicel·lulosa en la pasta de paper), o en la indústria de detergents. En química orgànica, les GHs poden ser utilitzades com a catalitzadors sintètics per formar enllaços glicosídics mitjançant hidròlisi reversa, en què la posició d'equilibri s'inverteix, o en reaccions de transglicosilació catalitzant la transferència d'una unitat de carbohidrat activada a un alcohol receptor generant un nou glicòsid. S'han desenvolupat diferents mutants de GHs, anomenats glicosintases, que permeten la síntesi de glicòsids amb alts rendiments mitjançant unitats de carbohidrat activades com ara glicòsids fluoroderivats.

I.1.1. Classificació

Les GHs estan classificades, segons la *Enzyme Commission*¹², en EC 2.3.1 com a enzims que catalitzen la hidròlisi de glicòsids (–O–) o tioglicòsids (–S–). Les GHs també poden ser classificades atenent a l'estereoquímica resultant de la reacció de hidròlisi: retenció o inversió de configuració del carboni anomèric. Més endavant es descriuen ambdós mecanismes enzimàtics (secció I.1.3). Les GHs es poden considerar com a *exo*-glicosidases o com a *endo*-glicosidases, segons si la hidròlisi té lloc a l'extrem no reductor del polisacàrid o en mig de la cadena, respectivament.

INTRODUCCIÓ

Una altra classificació és la que té en compte similitud de seqüència. Aquest tipus de classificacions són un dels mètodes predictius més potents per tal de predir la funció de noves seqüències d'enzims. La base de dades en línia CAZy (www.cazy.org, setembre 2007) conté una classificació actualitzada de les GHs basada en seqüència¹³. Actualment cobreix unes 30000 seqüències de diferents GHs i homòlegs, agrupades en més de 100 famílies. El tipus de mecanisme enzimàtic es manté entre els membres d'una mateixa família. A més, una anàlisi en detall de les seqüències i de la seva estructura terciària (per a les que està disponible) permet mostrar relacions evolutives entre diferents famílies. Per exemple, les famílies relacionades amb un mateix mecanisme catalític i similituds estructurals s'han agrupat en 14 clans diferents¹⁴.

I.1.2. Estructura

Degut a la seva gran diversitat, les GHs han estat subjecte de diversos estudis. Mitjançant tècniques de difracció de raigs X, ha estat possible elucidar l'estructura tridimensional d'un gran nombre de GHs de diferents famílies. L'estudi pioner de *Blake et al.*¹⁵ a finals dels anys 60 determinà l'estructura tridimensional de la lisosima present en la clara d'ou de gallina (HEWL). Des de llavors l'aparició de noves estructures cristal·logràfiques per a les diferents famílies de les GHs s'ha anat incrementant amb el temps. Estructuralment, aquestes es poden agrupar en tres grups segons la topologia del centre catalític³: **butxaca**, **fissura** o **túnel** (veure Figura I.1). En general, el procés d'unió del substrat a l'enzim serà diferent segons la topologia del centre actiu.

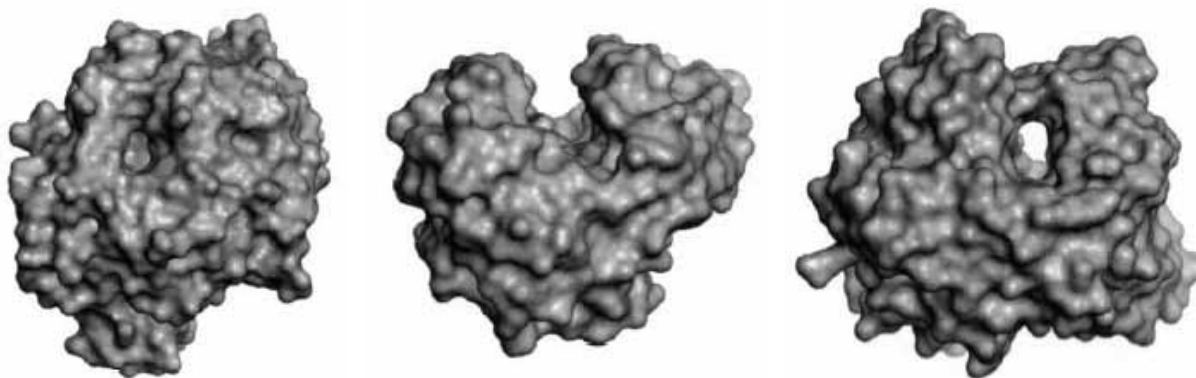


Figura I.1. Tres tipus diferents de topologia trobades en GHs (a) butxaca, (b) fissura, i (c) túnel

La topologia en forma de **butxaca** és òptima per al reconeixement d'extrem no reductor de sacàrids. És freqüent trobar-la en monosacaridases com la β -galactosidasa, β -glucosidasa, sialidasa i neuraminidasa. També és una conformació típica en exopolisacaridases com la glucoamilasa i la β -amilasa. Aquestes exopolisacaridases estan adaptades a substrats amb un gran nombre d'extrem de cadena (com per exemple en grànuls de midó, d'estructura radial i amb els extrems no reductors a la superfície). Tanmateix, aquests enzims no són

eficients per substrats fibrosos, com la cel·lulosa, per als quals gairebé no existeixen extrems de cadena lliures.

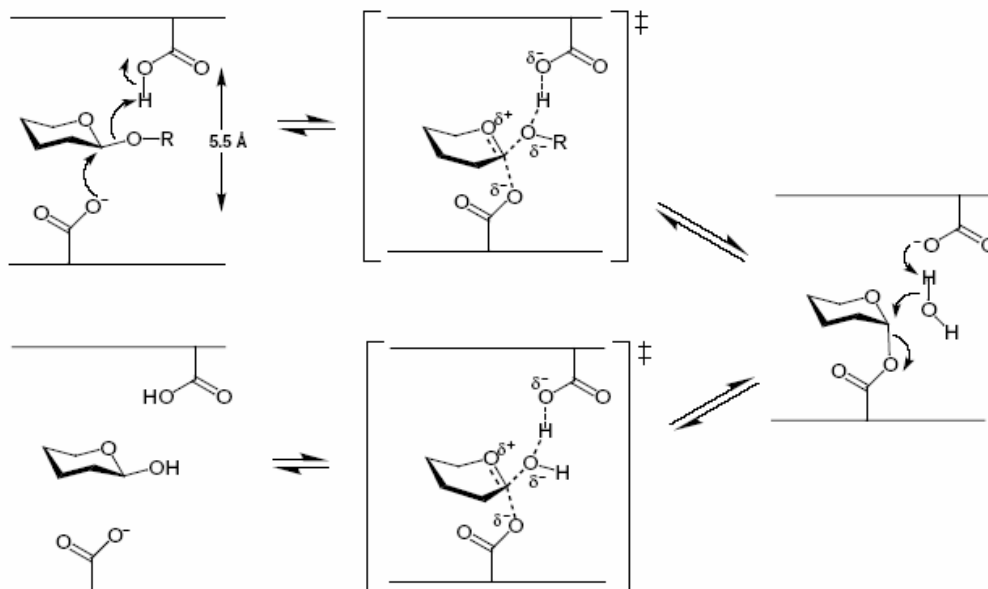
La conformació en topologia de **fissura**, resulta en una estructura més oberta que l'anterior i permet la unió aleatòria de diferents unitats de sucre de substrats polimèrics. És comú trobar-la en *endo*-polisacaridases en general com ara lisosimes, endocel·lulases, quitinases, α -amilases, xilanases o glucanases entre altres. L'enzim en el qual es centra la present tesi, la 1,3-1,4- β -glucanasa, presenta una topologia del centre actiu en forma de fissura (Figura I.17 a la pàgina 24).

Per últim, la topologia del centre actiu en forma de **túnel**, es pot considerar com una evolució de l'anterior en què la proteïna desenvolupa grans *loops* que cobreixen part de la fissura. Fins ara, només s'ha trobat topologies de tipus túnel en celobiohidrolases. El pas deixat pel túnel, acomoda una cadena de polisacàrid per a ser hidrolitzat. Aquesta conformació permet a l'enzim alliberar el producte de reacció mentre es manté fermament unit a la cadena de polisacàrid, així aquesta cadena pot ser processada successivament. Aquesta característica és clau per a la degradació enzimàtica de cel·lulosa.³

I.1.3. Mecanisme Catalític

La hidròlisi enzimàtica d'enllaços glicosídics té lloc mitjançant catàlisi àcida/bàsica i requereix dos residus essencials: un donador de protons (àcid general), i un nucleòfil (ó base general). Ambdós residus es conserven en totes les famílies de les GHs²⁻⁶. La hidròlisi de l'enllaç glicosídic pot portar-se a terme mitjançant dos grans mecanismes diferents; l'un amb *retenció de configuració* del carboni anomèric, i l'altre amb *inversió de configuració* sobre el carboni anomèric¹ (Figura I.2). Ambdós mecanismes comparteixen el primer pas de reacció, en el que el residu àcid general protona l'oxigen glicosídic i simultàniament s'inicia l'atac nucleòfil, que precisament és el que diferencia ambdós mecanismes. Així com en les glicosidases amb retenció de configuració (com ara la 1,3-1,4- β -glucanasa), és el mateix residu nucleòfil el que perpetua l'atac nucleofílic sobre el carboni anomèric, en les glicosidases amb inversió de configuració, és una molècula d'aigua la que porta a terme l'atac. El caràcter nucleòfil de la molècula d'aigua es veu augmentat per la interacció amb el residu base general.

(a) retenció de configuració



(a) inversió de configuració

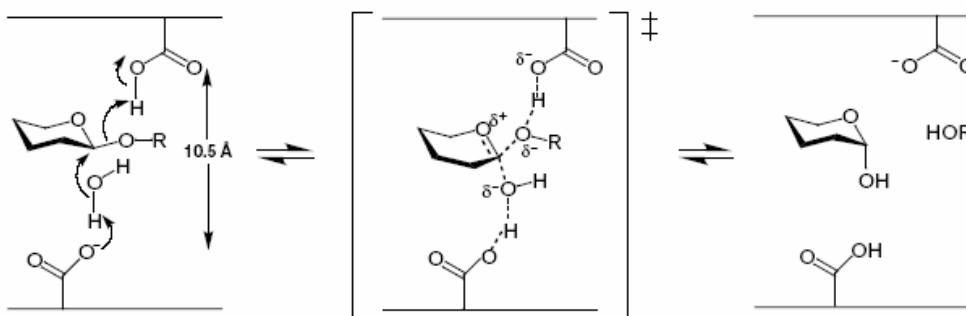


Figura 1.2. Mecanisme enzimàtic en β -GHs amb **(a) retenció de configuració**,
i **(b) inversió de configuració** sobre el carboni anomèric.

Les distàncies mostrades són un promig de diferents GHs (veure discussió al text).²

En ambdós mecanismes, la posició relativa del residu àcid general és idèntica (a una distància de pont d'hidrogen de l'oxigen glicosídica), mentre la del nucleòfil és diferent. En enzims que actuen amb retenció de configuració, el nucleòfil es situa pròxim al carboni anomèric (~5.5 Å), mentre que aquesta distància es fa més gran (~10.5 Å) en enzims que actuen amb inversió de configuració degut a la necessitat d'acomodar una molècula d'aigua entre el nucleòfil i el sucre² (veure Figura 1.2).

La catàlisi àcida i l'atac nucleòfil simultanis resulten en un estat de transició de tipus oxocarbocatiònic comú per ambdós mecanismes. Per a les GHs amb inversió de configuració, la reacció prossegueix cap al producte final. Mentre que per a les GHs es forma l'intermedi de reacció (intermedi covalent glicosil-enzim) i s'allibera la unitat no reductora del substrat hidrolitzat, que és el primer producte de reacció. En una segona etapa, el residu àcid/base general, ara desprotonat i actuant com a base general, exalça la nucleofília d'una

molècula d'aigua que ataca el carboni anomèric per la banda oposada a l'enllaç glicosil-enzim, aconseguint així desplaçar la unió del substrat a l'enzim, i alliberant el segon producte de reacció. Aquesta etapa també té lloc a través d'un estat de transició oxocarbocatiònic.

Aquest mecanisme de reacció de les GHs que actuen amb retenció de configuració (anomenat de doble desplaçament) fou proposat inicialment per *Koshland* l'any 1953¹. A continuació es descriuen les evidències experimentals que recolzen l'existència d'un estat de transició de tipus oxocarbocatiònic, i de la formació d'un intermedi covalent glicosil-enzim.

1.1.3.1. Estat de Transició Oxocarbocatiònic.

Mesures d'efectes cinètics isotòpics secundaris de deuteri sobre l'hidrogen α del carboni anomèric del substrat, indiquen que la hibridació del carboni anomèric canvia en l'estat de transició, de sp^3 a sp^2 (veure Figura 1.2). La hibridació sp^2 correspon necessàriament a una estructura de tipus oxocarbocatiònica on el carboni anomèric i l'oxigen pirànic, junt amb els carbonis adjacents, presenten una conjugació coplanarⁱ. Així doncs, aquests experiments mostren que l'estat de transició en les GHs és de tipus oxocarbocatiònic⁵.

Una altra evidència de l'existència d'un estat de transició oxocarbocatiònic sorgeix de l'observació que inhibidors d'aquestes característiques (afins a l'estat de transició), s'uneixen a l'enzim amb unes constants d'afinitat elevades⁷.

1.1.3.2. Intermedi Covalent Glicosil-Enzim

A fi de detectar la formació d'un intermedi covalent glicosil-enzim, *Withers* i col. introduïren els substrats 2-desoxi-2-fluoro-derivats²⁸. Aquests inhibidors desestabilitzen per efecte inductiu del desenvolupament de càrrega positiva en l'estat de transició (oxocarbocatiònic). A més, es perd la interacció per pont d'hidrogen present entre el grup 2-OH de l'anell del substrat i el residu nucleòfil ($2\text{-OH} \cdots ^-\text{OOC-Nu}$). Aquests efectes desestabilitzants es contraresten mitjançant l'ús de bons grups sortints (com per exemple nitrofenols) la qual cosa permet l'acumulació de l'intermedi covalent⁶.

En un treball recent de *Davies i col.*³⁵, s'ha resolt l'estructura cristal·logràfica d'un intermedi glicosil-enzim d'una β -glicosidasa amb retenció de configuració amb un substrat 2-desoxi-2-fluoro-derivat. A més, es recullen estructures cristal·logràfiques corresponents a diferents etapes de la reacció de doble desplaçament. Aquest treball és l'únic que dona una imatge completa del mecanisme catalític de les GHs amb retenció de configuració.

ⁱ posteriorment es donaran detalls de les conformacions del substrat que satisfan aquesta coplanaritat

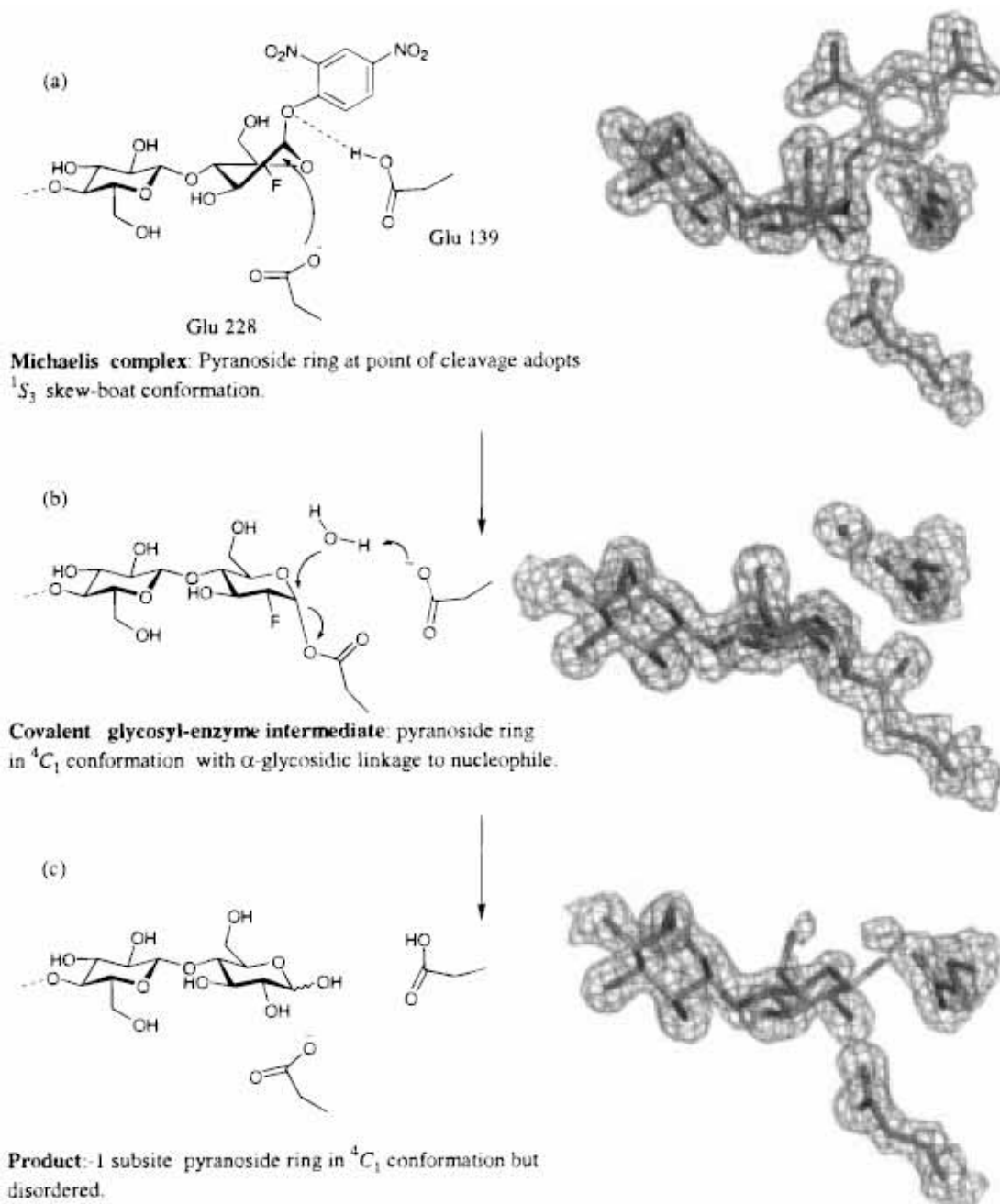


Figura 1.3. Estructures al llarg de la coordenada de reacció en cel·lulasa Cel5A.³⁵

La Figura 1.3 mostra les estructures obtingudes al llarg de la coordenada de reacció. En primer lloc, l'estructura del complex de *Michaelis*, format entre l'enzim i el substrat, en la que s'observa com el substrat adopta una conformació distorsionada. En segon lloc, l'estructura de l'intermedi covalent glicosil-enzim. Es pot observar que el sucre adopta la conformació cadira 4C_1 . I per últim, l'estructura del complex entre l'enzim i el producte, en la que l'anell de glucopiranosita es disposa també en una conformació de cadira 4C_1 .

I.1.4. Complex de *Michaelis*

Actualment, l'existència d'estructures distorsionades a nivell de substrat en formar-se el complex de *Michaelis* de β -GHs (com l'observada en la cel·lulasa Cel5A, Figura I.3) és un fet demostrat: no s'ha trobat cap complex E·S on el substrat no adopti una conformació distorsionada. A la Taula I.1 es recullen algunes de les estructures cristal·logràfiques més rellevants en aquest sentit.

Família	Glicosidasa	Confòrmer ⁱⁱ	Any Referència
22	Lisosima HEWL	sofà	1991 ²⁶
20	<i>Serratia Marcescens</i> Chitobiase	sofà	1996 ²⁷
7	<i>Fusarium Oxysporum</i> Endoglucanasa I	¹ S ₃	1996 ³³
5	<i>Bacillus Agaradhaerens</i> Cel5A cel·lulasa	¹ S ₃	1998 ³⁵
6	<i>Trichoderma reesei</i> Cel6A celobiohidrolasa	² S ₀	1999 ²⁹
6	<i>Humicola Insolens</i> Cel6A celobiohidrolasa	² S ₀	2002 ³⁸
8	<i>Clostridium Thermocellum</i> CelA	^{2,5} B	2002 ⁴⁰
26	<i>Cellvibrio Japonicus</i> mananasa	¹ S ₅	2002 ⁴¹

Taula I.1. Conformacions del substrat observades en diferents complexos E·S de β -GHs.

La distorsió del substrat en unir-se a les β -GHs fou proposada inicialment per Phillips i col.^{16,17} en base a l'estudi dels complexos amb oligosacàrids en el seu treball sobre la lisosima HEWL¹⁵. Aquest treball dona una explicació en base a la teoria del control estereoelèctric^{9,11}. Posteriorment, a partir de l'anàlisi de les estructures cristal·logràfiques han anat apareixent altres justificacions d'aquest tipus d'unió del substrat a les β -GHs, el qual té implicacions en el mecanisme de la reacció enzimàtica.

I.1.4.1. Implicació Estereoelèctrica en la Distorsió del Substrat

La teoria del control estereoelèctric^{9,10} proposa que la hidròlisi d'ortoèsters, acetals i compostos relacionats (com oligosacàrids) es veu afavorida per conformacions del reactiu en les que el parell elèctric no enllaçant de l'oxigen es disposa en forma antiperiplanar a l'enllaç del grup sortint (veure Figura I.4). Aquesta teoria es coneix també amb el nom de la ALPH (*Antiperiplanar Lone-Pair Hypothesis*).

ⁱⁱ a l'apartat I.2 es descriuen les diferents conformacions d'un anell de glucopiranosà

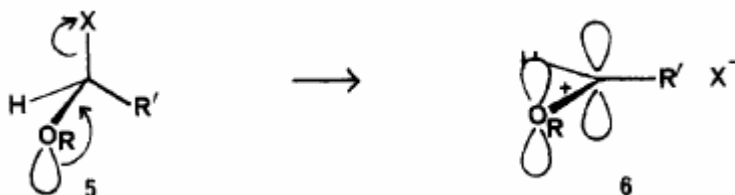


Figura 1.4. Representació esquemàtica de la teoria del control estereoelectrònic (ALPH).

Aquesta conclusió de la ALPH, té implicacions importants pel que fa al mecanisme de reacció de la lisosima, i per extensió, al de qualsevol altra β -glucosil hidrolasa¹¹.

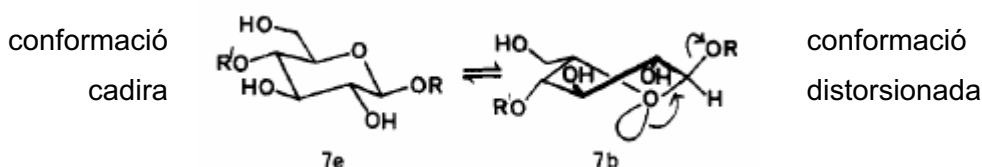


Figura 1.5. Disposicions els parells electrònics solitaris en dues conformacions diferents d'un anell de β -glucopiranososa.

En l'estat fonamental d'un anell de β -glucopiranososa, conformació cadira, l'aglicó (OR) es disposa en una orientació equatorial, de manera que només és antiperiplanar respecte als enllaços de l'anell. Així doncs, el trencament de l'enllaç glicosídic en aquest cas és de preveure que sigui desfavorable estereoelectrònicament parlant.

Si la barrera estereoelectrònic és suficientment gran, la reacció hauria de tenir lloc a través d'alguna conformació que no fos la de l'estat fonamental, com ara a través d'una conformació distorsionada. En aquesta conformació, l'aglicó es disposa en orientació axial, de manera que un dels parells electrònics solitaris de l'oxigen pirànic es disposa en forma antiperiplanar a l'enllaç glicosídic, facilitant-ne així la seva escissió. El principal factor que dirigeix el trencament de l'enllaç glicosídic és la donació electrònica de l'oxigen pirànic, el qual acomoda la major part de la càrrega positiva¹¹.

És raonable pensar que els enzims no adquireixen la seva característica d'incrementar en gran mesura la velocitat de reacció del seu corresponent procés sense no abans mobilitzar tots els factors que afavoreixin el camí de reacció, inclosos en aquest cas factors estereoelectrònics. Per tant, si la barrera estereoelectrònic és suficientment alta, la hidròlisi enzimàtica d'un enllaç β -glicosídic ha d'involucrar alguna mena de distorsió en la conformació del substrat en un moment previ a l'inici del procés enzimàtic (formació del complex de *Michaelis*).

I.1.4.2. Efectes Estèrics

Un altre aspecte important a tenir en compte és el comentat per *Davies i col.* en el seu treball sobre la cel·lulasa Cel5A³⁵. En la conformació adoptada pel substrat en unir-se a l'enzim (per exemple en forma d'un skew ¹S₃, Figura I.6) es facilita l'atac del nucleòfil ja que ha desaparegut l'impediment estèric per part de l'H del carboni anomèric.

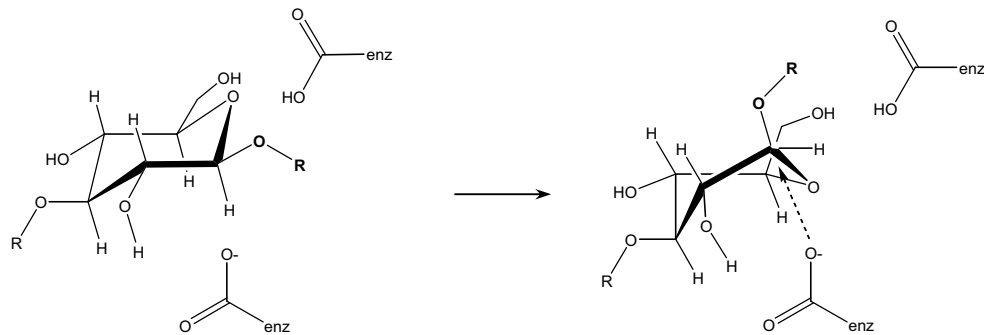


Figura I.6. Alliberació de l'impediment estèric en la distorsió del substrat.

I.1.4.3. Aproximació Estructural a l'Estat de Transició

Tal com es veurà més endavant (secció I.2.2), les estructures distorsionades a nivell de substrat presents en β -GHs s'assemblen a l'estructura de l'estat de transició oxocarbocatiònic de la reacció enzimàtica²⁵, en què els àtoms C2–C1–O5–C5 es disposen en un mateix pla (secció I.1.3.1). És a dir que les β -GHs acomoden el substrat en la direcció de la reacció enzimàtica.

Així doncs, es pot resumir que la formació del complex de *Micahelis* té favorables implicacions mecanístiques. L'enzim inverteix energia en la unió al substrat preactivant-lo de cara a la reacció enzimàtica, satisfent els següents requeriments:

- disposar l'enllaç glicosídic (C1–O1) en orientació axial i antiperiplanar al parell solitari de l'oxigen pirànic (teoria ALPH)¹¹.
- disposar l'enllaç entre el carboni anomèric i el corresponent àtom d'hidrogen (C1–H1) en orientació equatorial. Això deixa espai per a l'atac del residu nucleòfil³⁵.
- aproximar el substrat estructuralment a l'estat de transició²⁵.

I.2. Conformacions de β -D-Glucopiranososa

L'anell de β -D-glucopiranososa presenta una elevada flexibilitat, podent adoptar diferents conformacions. Per això, s'ha cregut convenient dedicar aquest apartat a descriure aspectes relacionats amb aquestes conformacions (nomenclatura, representació, ...) que s'utilitzaran sovint en aquesta tesi.

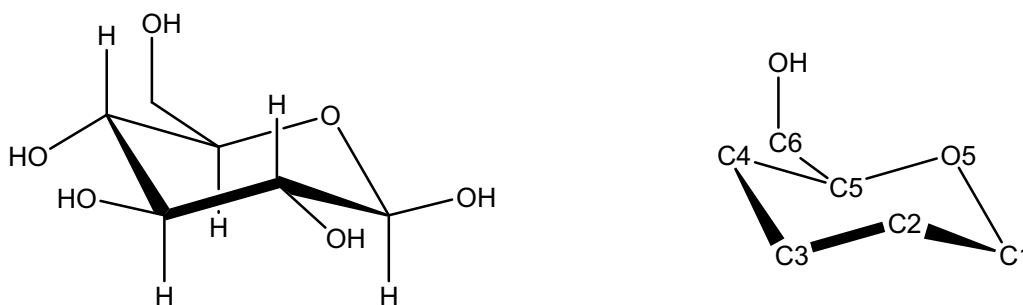


Figura I.7. Representació de la molècula de β -D-glucopiranososa- 4C_1 i numeració dels àtoms.

I.2.1. Nomenclatura

La nomenclatura per definir les diferents conformacions d'un anell de glucopiranososa està regulada per les normes IUPAC⁵⁷. Existeixen 26 conformacions diferents que es poden agrupar en quatre tipus de conformacions: *cadira*, *boat*, *skew* i *half*, representades per les lletres C, B, S i H respectivament. Per a cada un d'aquests tipus de conformacions, cal definir un pla de referència entre 4 àtoms de l'anell. Els índexs dels dos àtoms restants acompanyen a la lletra representativa de cada conformació. El superíndex indica que l'àtom en qüestió està situat per sobre del pla, i el subíndex que està per sota del pla de referència.

Chair: el pla de referència està definit per dos costats paral·lels de l'anell, escollits de tal manera que sigui l'àtom de carboni amb menor numeració el que resti fora del pla, disposant-se l'àtom restant a l'altra banda del pla. Les possibles conformacions són 4C_1 i la inversa 1C_4 .

Boat: el pla de referència està definit també per dos costats paral·lels de l'anell. En aquest cas, ambdós àtoms restants estan ubicats a la mateixa banda del pla. Les possibles conformacions són $^{1,4}B$, $B_{1,4}$, $^{2,5}B$, $B_{2,5}$, $^{0,3}B$, $B_{0,3}$.

Skew: per cada conformació *skew* és possible definir dos plans que contenen tres àtoms adjacents, i el restant àtom no adjacent. El pla de referència és llavors escollit de tal manera que l'àtom de l'anell, amb un índex de numeració menor, o el següent, resti exoplanar. Les possibles conformacions són 1S_3 , 3S_1 , 1S_5 , 5S_1 , 0S_2 , 2S_0 .

Half: el pla de referència està definit per 4 àtoms coplanars adjacents. Els dos àtoms restants queden ubicats l'un per sobre del pla i l'altre per sota. Lògicament, aquesta és una estructura un tant tensa per a anells de glucopiranososa. Les possibles conformacions són ${}^0\text{H}_1$, ${}^1\text{H}_0$, ${}^1\text{H}_2$, ${}^2\text{H}_1$, ${}^2\text{H}_3$, ${}^3\text{H}_2$, ${}^3\text{H}_4$, ${}^4\text{H}_3$, ${}^4\text{H}_5$, ${}^5\text{H}_4$, ${}^5\text{H}_0$, ${}^0\text{H}_5$.

A la Taula I.2 es mostren els plans definits en estructures representatives de cada tipus de conformació.

Tipus de conformació	Representació esquemàtica	Àtoms que defineixen el pla	Nom assignat a la conformació
<i>Chair</i>		C2–C3 --- O5–C5	${}^4\text{C}_1$
<i>Half</i>		C2–C1–O5–C5	${}^4\text{H}_3$
<i>Skew</i>		C2 --- C4–C5–O5	${}^1\text{S}_3$
<i>Boat</i>		C2–C3 --- C5–O5	${}^{1,4}\text{B}$

Taula I.2. Nomenclatura de les diferents conformacions d'un anell de glucopiranososa

INTRODUCCIÓ

*Stoddart*⁵⁸ agrupà en un diagrama, mostrat a la Figura I.8, totes les possibles conformacions d'un anell de glucopiranosà. Aquest diagrama recull de forma esquemàtica les diferents conformacions que pot anar assolint un anell de glucopiranosà al voltant de la conformació cadira 4C_1 , i les seves interconversions directes. D'ara endavant es farà referència a aquest diagrama com a el diagrama de *Stoddart*.

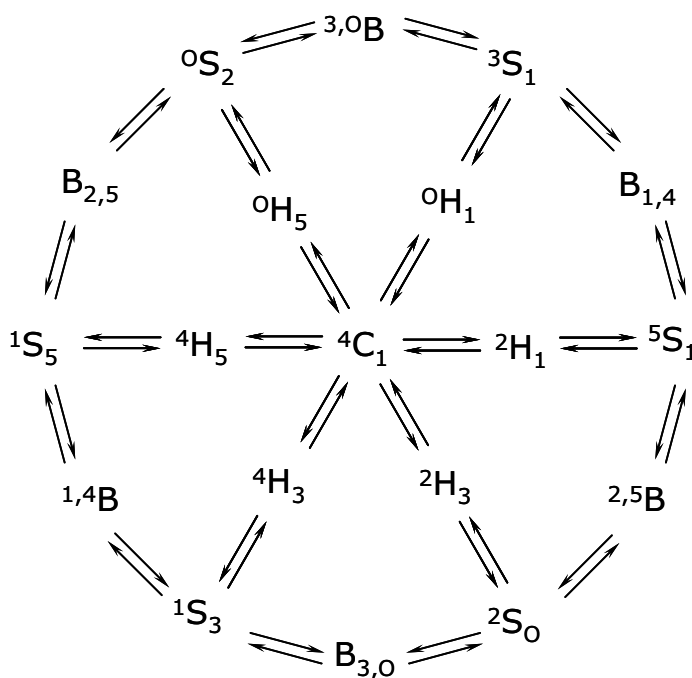
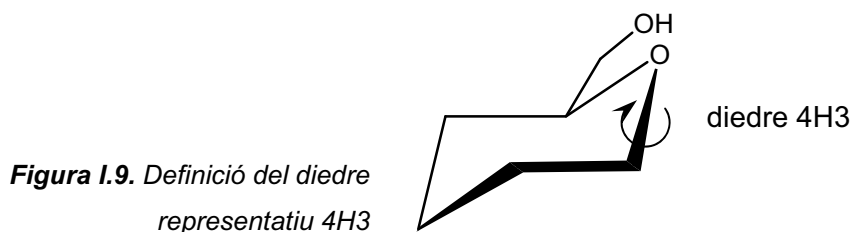


Figura I.8. Diagrama conformacional de *Stoddart* per a un anell de glucopiranosà

Per tal de seguir l'evolució conformacional d'un anell de glucopiranosà durant un determinat procés (per exemple al llarg d'una simulació de la formació del complex de *Michaelis*), en aquesta tesi s'han emprat tres representacions diferents: (1) projectar aquesta evolució sobre el diagrama de *Stoddart*, (2) seguir l'evolució d'un angle diedre concret de l'anell, o (3) calcular les coordenades d'empaquetament⁵⁹ de l'anell.

I.2.1.1. Diedre Representatiu d'una Transició Conformacional

Les diferents transicions entre conformacions de l'anell de glucopiranosà mostrades a la Figura I.8, poden ser representades per diferents angles diedres. Per exemple, l'angle diedre format pels àtoms C2–C1–O5–C5 és representatiu de la transició ${}^4C_1 \leftrightarrow {}^4H_3 \leftrightarrow {}^1S_3$.



En la conformació intermèdia (4H_3), aquest diedre pren el valor de 0° . Alhora, les conformacions cadira i *skew* presenten un valor de diedre de signe oposat (positiu per a la conformació 1S_3 i negatiu per a la conformació 4C_1). D'ara endavant, aquest diedre se l'anomenarà diedre 4H3 (sense superíndexs ni subíndexs per tal de no confondre amb la

nomenclatura de les conformacions). D'aquesta manera, en una simulació de dinàmica molecular d'un sistema d'aquestes característiques, el seguiment d'aquest diedre en el temps permetrà observar les transicions que tenen lloc entre aquestes conformacions.

De forma general, es poden definir altres diedres representatius d'altres transicions, prenent el mateix criteri pel qual l'estructura intermèdia tingui un valor de diedre igual a 0°. Per exemple, el diedre 1,4B permetrà analitzar la transició entre la conformació 1S_3 (valors positius) i 1S_5 (valors negatius).

1.2.1.2. Coordenades d'Empaquetament

L'ús de diedres representatius és una manera ràpida i eficaç de distingir entre dues conformacions properes. Així, al capítol III de resultats, s'empren representacions precisament del diedre 4H3 i del diedre 1,4B. Però si el que es pretén és poder discernir entre totes les possibles conformacions d'un anell de glucopiranososa, cal recórrer a altres coordenades més complexes que tinguin en compte tota la variabilitat conformacional d'aquests sistemes.

*Cremer i Pople*⁵⁹ van definir un sistema de coordenades que permet descriure de manera quantitativa la conformació de qualsevol sistema cíclic de qualsevol mida a partir només de les coordenades nuclears els àtoms que constitueixen l'anell. Seguidament es descriu el procediment per obtenir aquestes coordenades per a un anell de sis membres que són amb els que es treballa en aquesta tesi.

Suposem que les posicions dels nuclis d'un anell de 6 àtoms estan especificades per les corresponents coordenades cartesianes (X_j , Y_j , Z_j) o pels vectors de posició R_j ($j=1, 2, \dots, 6$). Inicialment aquestes poden ser respecte qualsevol origen de coordenades, però és convenient, per al següent desenvolupament, moure l'origen al centre geomètric. Amb aquest origen, les vectors de posició satisfan que

$$\sum_{j=1}^6 R_j = 0 \quad \text{eq.1}$$

A fi de definir un sistema de coordenades d'empaquetament, és desitjable especificar el desplaçament de cada nucli de l'anell respecte un pla promig. Aquest pla serà definit de manera que passi pel centre de coordenades. Així, es pot escollir un nou conjunt de coordenades cartesianes (x_j , y_j , z_j) de manera que l'origen de coordenades estigui en el centre, i que l'eix z sigui perpendicular al pla promig. L'eix y s'escull de manera que passi a través de la projecció de la coordenada nuclear de l'àtom 1 de l'anell sobre el pla

INTRODUCCIÓ

promig. Aquest nou sistema de coordenades serà una simple transformació lineal del sistema de coordenades original (X_j, Y_j, Z_j). Segons aquestes condicions, s'assegura que

$$\sum_{j=1}^6 z_j = 0 \quad \text{eq.2}$$

i l'orientació del pla promig ($z = 0$) queda determinada per les següents condicions:

$$\begin{aligned} \sum_{j=1}^6 z_j \cos[2\pi(j-1)/N] &= 0 \\ \sum_{j=1}^6 z_j \sin[2\pi(j-1)/N] &= 0 \end{aligned} \quad \text{eq.3}$$

Per procedir a la transformació lineal dels vectors de posició originals (R_j), tenint en compte aquestes condicions, cal definir dos nous vectors

$$\begin{aligned} R' &= \sum_{j=1}^6 R_j \sin[2\pi(j-1)/N] \\ R'' &= \sum_{j=1}^6 R_j \cos[2\pi(j-1)/N] = 0 \end{aligned} \quad \text{eq.4}$$

i el vector unitari

$$n = R' \times R'' / |R' \times R''| \quad \text{eq.5}$$

serà doncs perpendicular a R' i a R'' . Aquest vector serà escollit com a l'eix z , de manera que els desplaçaments respecte el pla promig vindran donats pels productes escalars

$$z_j = R_j \cdot n \quad \text{eq.6}$$

Les coordenades d'empaquetament definides per *Cremer* i *Pople* són funció d'aquests desplaçaments atòmics (z_j). Per a un anell de 6 membres, aquestes s'obtenen resolent el següent sistema d'equacions:

$$\begin{cases} Q \sin \theta \cos \phi = \sqrt{\frac{1}{3}} \sum_{j=1}^6 z_j \cos \left[\frac{2\pi}{6} 2(j-1) \right] \\ Q \sin \theta \sin \phi = \sqrt{\frac{1}{3}} \sum_{j=1}^6 z_j \sin \left[\frac{2\pi}{6} 2(j-1) \right] \\ Q \cos \theta = \sqrt{\frac{1}{6}} \sum_{j=1}^6 (-1)^{j-1} z_j \end{cases} \quad \text{eq.7}$$

Així doncs, a partir de les 6 coordenades atòmiques (18 components), es defineixen 3 coordenades esfèriques (un radi Q i dues fases θ i ϕ) que descriuen inequívocament totes les possibles conformacions d'un sistema molecular cíclic de 6 membres. S'ha aconseguit

doncs, una important reducció de la dimensionalitat del problema. A la Figura I.10 es mostra una representació esquemàtica d'aquest sistema de coordenades i es relaciona amb totes les conformacions accessibles per a un anell de glucopiranososa.

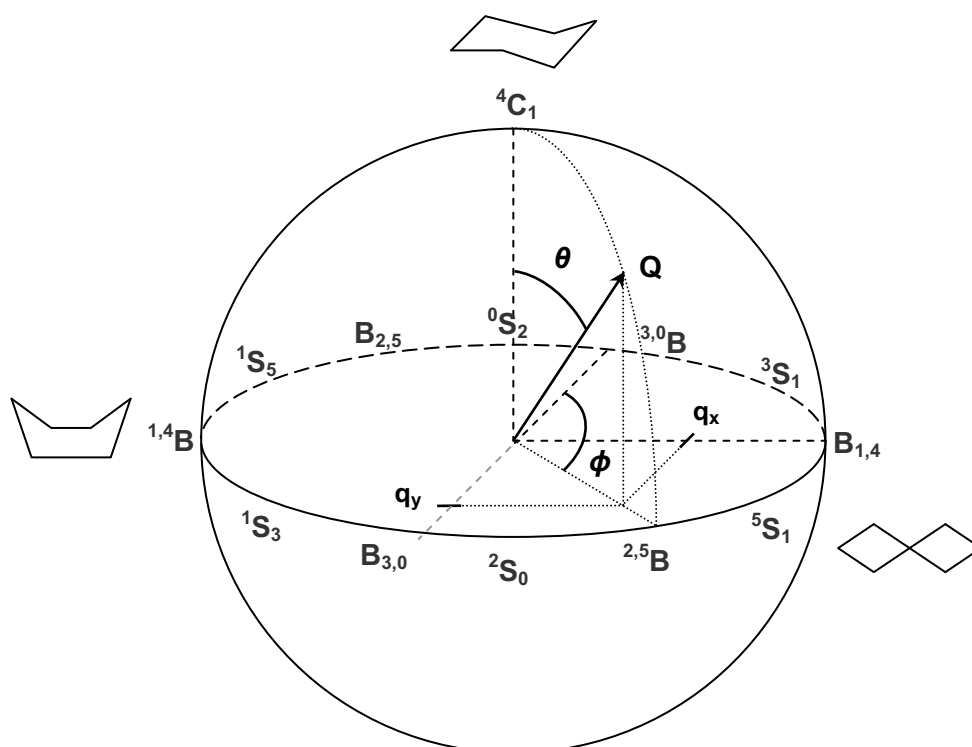


Figura I.10. Representació de les coordenades esfèriques d'empaquetament per a un anell de 6 membres.

D'aquesta manera, totes les possibles conformacions d'un anell de glucopiranososa es poden localitzar a la capa externa d'una esfera de radi Q . Als pols ($\theta = 0$ i π) es localitzen les dues conformacions cadira (4C_1 i 1C_4), mentre que a l'equador ($\theta = \pi/2$) es localitzen les 6 conformacions *skew* i les 6 conformacions *boat* (en fraccions successives ϕ de $\pi/6$).

I.2.2. Itinerari Seguit en Diferents Glicosil Hidrolases

Tal com s'ha comentat en la descripció del mecanisme (apartat I.1.3), el procés enzimàtic d'hidròlisi d'enllaços glicosídics passa a través d'un intermedi covalent. Diferents experiments evidencien l'existència d'aquest intermedi, així com l'existència de complexos de *Michaelis* en els que el substrat presenta una distorsió respecte l'estructura fonamental de cadira 4C_1 (veure Taula I.1). Tot plegat permet establir relacions entre les conformacions que va assolint l'anell de glucopiranososa al llarg de tot el procés enzimàtic en base al diagrama de *Stoddart*. *Davies i col.*, en un article recent²⁵, analitzen la informació cristal·logràfica de què es disposa per a diferents GHs. D'aquesta manera són capaços de trobar grups de famílies en què el substrat segueix el mateix itinerari conformacional (Figura I.12) al llarg de la reacció enzimàtica.

INTRODUCCIÓ

El camí de reacció de les GHs, ja sigui amb inversió o amb retenció de configuració del carboni anomèric, passa a través d'un estat de transició oxocarbocatiònic (veure Figura I.2). El caràcter parcial de doble enllaç O5–C1 requereix que els àtoms C5, O5, C1 i C2 es disposin de forma coplanar. Tal com es mostra a la Figura I.11, això només és possible per a dues conformacions tipus *half* (${}^4\text{H}_3$ i ${}^3\text{H}_4$) i per a dues conformacions tipus *boat* (${}^{2,5}\text{B}$ i $\text{B}_{2,5}$).

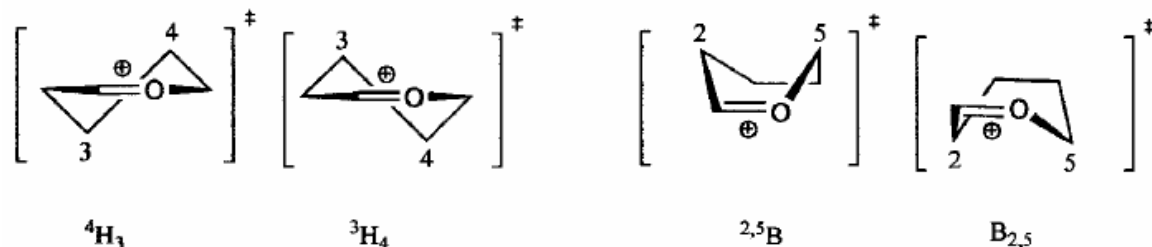


Figura I.11. Estats de transició proposats que satisfan la coplanaritat de C5, O5, C1 i C2.

Però, quina conformació per a l'estat de transició és emprada per a un glicosil hidrolasa en particular? Doncs, tot i que aparentment sembla que la hidròlisi d'enllaços glicosídics passa a través d'un estat de transició en conformació ${}^4\text{H}_3$ (i així queda reflectit en les representacions esquemàtiques clàssiques del mecanisme), hi ha diverses evidències experimentals recents que aquest fet no és exclusiu²⁵.

Un estat de transició en conformació ${}^4\text{H}_3$ ha estat suggerit per a la *endo*-glucanasa I en base a l'estructura cristal·logràfica del complex de *Michaelis* amb un tio-ologosacàrid³³ (conformació ${}^1\text{S}_3$ del substrat), i per a la cel·lulasa Cel5A complexada amb un fluoroderivat³⁵ (complex de *Michaelis* ${}^1\text{S}_3$, intermedi covalent ${}^4\text{C}_1$). Aquesta deducció ve del fet d'observar que, en el diagrama de *Stoddart*, el camí per passar de la conformació ${}^1\text{S}_3$ (complex de *Michaelis*) a la conformació ${}^4\text{C}_1$ (intermedi covalent) passa per la conformació ${}^4\text{H}_3$ (veure Figura I.12). Des del punt de vista estructural, aquesta conformació està adaptada per a un estat de transició oxocarbocatiònic (Figura I.11).

D'altra banda, un treball recent de *Ducros i col.*⁴¹, una β -mananasa de la família 26, mostra que hi ha distorsions del substrat fora d'aquesta regió. El substrat (inhibidor fluoroderivat) adopta, en aquest cas, un conformació tipus *skew* ${}^1\text{S}_5$. En el mateix article, els autors obtenen l'estructura de l'intermedi covalent glicosil–enzim, on el lligand adopta la conformació ${}^0\text{S}_2$. Segons el diagrama de *Stoddart*, per passar de la conformació ${}^1\text{S}_5$ (complex de *Michaelis*) a la conformació ${}^0\text{S}_2$ (intermedi covalent) només és possible si es travessa la conformació $\text{B}_{2,5}$ (veure Figura I.12). Des del punt de vista estructural, aquesta conformació està adaptada per a un estat de transició oxocarbocatiònic (Figura I.11).

Un tercer itinerari és el que s'ha proposat per a una xilanasa de la família 11. Sabini i col. observen que el substrat adopta una conformació ${}^{2,5}B$ en unir-se a l'enzim. Els autors argumenten⁴² que l'intermedi covalent i l'estat de transició compartrien la mateixa conformació a fi de satisfer el requeriment de coplanaritat que s'acaba de descriure.

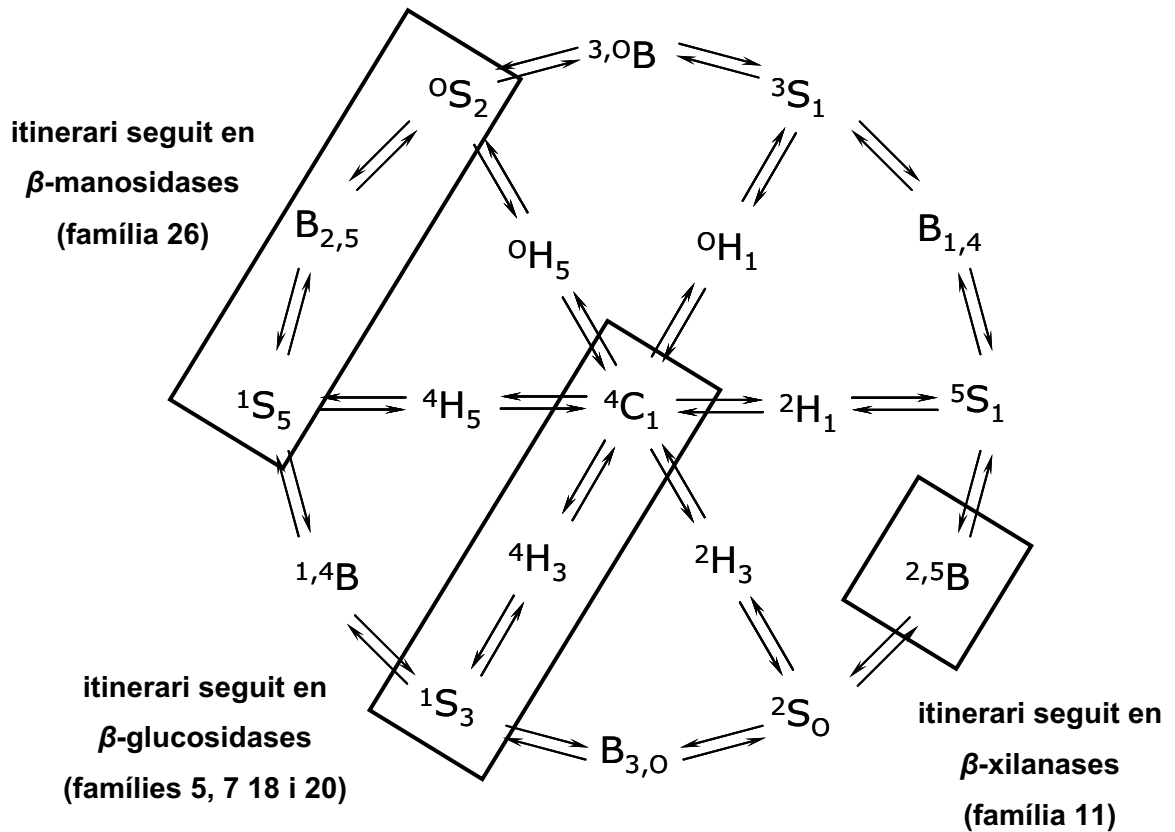


Figura I.12. Itinerari de reacció seguit en diferents glicosil hidrolases.

El fet d'entendre la conformació que assoleix l'estat de transició per a una determinada glicosil hidrolasa és un fet important de cara al disseny d'inhibidors per als respectius enzims. Ja que és conegut que el disseny d'inhibidors amb estructures similars a la de l'estat de transició s'uneixen a l'enzim amb constants d'afinitat molt majors respecte el substrat natural.

Un dels objectius de la present tesi serà analitzar l'itinerari conformacional que segueix el substrat de la 1,3-1,4- β -glucanasa al llarg de la reacció enzimàtica. Així mateix, la modelització teòrica permetrà determinar l'estructura de l'estat de transició i quantificar-ne les propietats estructurals i electròniques.

I.3. 1,3-1,4- β -glucans

Els 1,3-1,4- β -glucans son polisacàrids que es troben presents formant part estructural de les parets cel·lulars en plantes superiors de la família de les *Poaceae*, així com en l'endosperma de determinats cereals com ara civada, sègol, arròs i blat entre altres. L'endosperma amilaci, una especial característica de les *Poaceae*, és la raó principal per la qual els cereals són de tan elevada importància en la nutrició humana. Anualment es cultiven més d'un bilió de tones de grans de cereal. Només l'arròs i el blat constitueixen ja la meitat de les calories que el humans ingerim en la nostra dieta.

L'interès científic en els 1,3-1,4- β -glucans es centra en la seva presència en les indústries alimentàries animals. Però també tenen interès pels beneficis que ofereixen a les dietes humanes. Els 1,3-1,4- β -glucans són els constituents de la paret cel·lular responsables de la capacitat que tenen la civada i el sègol d'avena de reduir el colesterol present en el sèrum de persones hipercolesterolèmiques, així com de regular l'índex glicèmic en persones diabètiques. D'altra banda, els 1,3-1,4- β -glucans i els xilans de les parets cel·lulars de l'endosperma present en les farines, són importants factors que contribueixen també a la correcta qualitat en el procés d'elaboració del pa. Per la seva banda, la incompleta hidròlisi dels 1,3-1,4- β -glucans en el procés d'elaboració de la cervesa comporta problemes associats a l'elevada viscositat d'aquests glucans. Així, un dels principals problemes en la indústria cervesera son les múltiples complicacions que genera en l'emmagatzematge de la cervesa, ja que aquesta es torna tèrbola en presència de glucans no hidrolitzats.

Les diferents espècies en que es troben presents els 1,3-1,4- β -glucans els utilitzen com a elements estructurals de les parets cel·lulars en el procés de creixement, així com en l'endosperma en forma de material d'emmagatzematge que és hidrolitzat durant el procés de germinació per proveir d'una font extra de carboni durant les primeres etapes d'assentament i creixement de la llavor. El seu paper estructural en la paret cel·lular és el de formar capes compactes conjuntament amb les microfibrilles de cel·lulosa, on interaccionen amb d'altres glucans i proteïnes durant el creixement cel·lular.

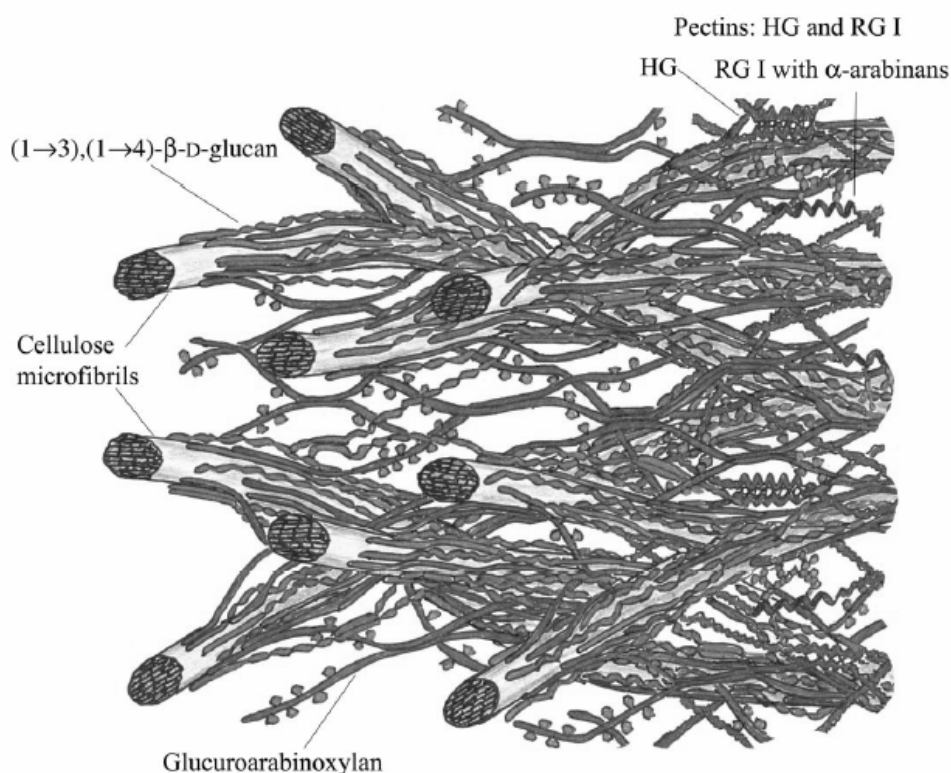


Figura I.13. Model estructural de la paret cel·lular per a cèl·lules de cereal en fase de creixement. ⁴⁵

Estructuralment parlant, es tracta de glucans lineals de fins a 1200 unitats de β -D-glucopiranososa, unides a través d'enllaços mixtes β -1,3- i β -1,4- glicosídics. Majoritàriament estan constituïts per unitats de cel·lotriosa i cel·lotetraosa separades per enllaços β -1,3, en una proporció molar de 3 a 1 per a les parets cel·lulars de teixits en fase de creixement i les parets de l'endosperma dels grans de cereal.



Figura I.14. Representació esquemàtica d'un 1,3-1,4- β -glucà.

Un cop iniciat el procés germinatiu, la major part dels polisacàrids constituents de l'endosperma, entre els que es troben els 1,3-1,4- β -glucans, són degradats per una bateria d'enzims hidrolítics (glicosil hidrolases). Aquesta degradació de la paret cel·lular permet l'accés d'altres glicosidases a altres substrats emmagatzemats a l'interior de l'endosperma. Les unitats de monosacàrid que són alliberades durant aquest procés d'hidròlisi són traslladades i aprofitades com a important font d'energia per al procés de creixement de la llavor.

I.4. La 1,3-1,4- β -glucanasa

La despolimerització dels 1,3-1,4- β -glucans té lloc a començaments del procés germinatiu i està catalitzada per glicosil hidrolases endògenes de diferent especificitat. Entre aquestes endoglicosidases, la més activa és la 1,3-1,4- β -glucanasa que mostra una elevada especificitat de substrat per al trencament d'enllaços β -1,4-glicosídics entre unitats de glucopiranososa 3-O-substituïdes.

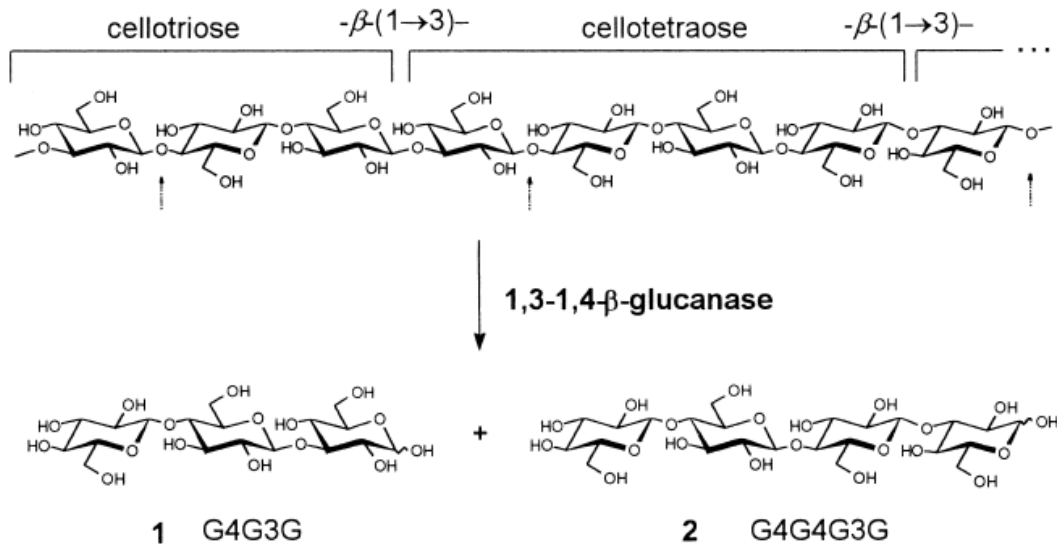


Figura I.15. Despolimerització enzimàtica de β -glucans.

No només les plantes produeixen aquest enzim, sinó que també determinats microorganismes com ara bacteries i fongs. Aquests segreguen 1,3-1,4- β -glucanases a fi de degradar polisacàrids que pugui haver en el seu entorn i així aprofitar-los com una font d'energia. Però les glucanases d'origen bacterià i les que provenen de les plantes no tenen una mateixa seqüència d'aminoàcids, ni tan sols presenten similitud estructural. Aquest fet és, doncs, un clar exemple d'una evolució diferent que ha convergit en una mateixa activitat i especificitat per substrat. De fet, la 1,3-1,4- β -glucanasa d'origen vegetal pertany a la família 17 de les glicosil hidrolases, mentre que la d'origen bacterià pertany a la família 16.

Anteriorment ja s'ha comentat la importància dels glucans de cara a la indústria alimentària, i la indústria de la cervesa. Per la seva banda, les 1,3-1,4- β -glucanases, també desperten interès per la seva aplicació biotecnològica en aquestes indústries. Així, per a la indústria cervesera, en el procés de maltatge, les 1,3-1,4- β -glucanases endògenes són inactivades tèrmicament degut a l'elevada temperatura del procés. És per aquest motiu que s'addicionen 1,3-1,4- β -glucanases termostables d'origen bacterià, a fi d'assegurar reduir la viscositat i poder assegurar així una major qualitat en el procés final. En quant a la indústria alimentària, preparats enzimàtics a base de β -glucanases exògenes són adicionats a les dietes, en base a blat, de pollastres i xais, per així assegurar una major digestibilitat i reduir futurs problemes sanitaris.

La present tesi centra el seu interès en el mode d'unió del substrat a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus* i en els mecanismes de preactivació del substrat de cara a la reacció enzimàtica. Aquest és un enzim àmpliament estudiat per *Planas i col.* Al llarg dels darrers anys, s'ha portat a terme una anàlisi completa del mecanisme enzimàtic mitjançant diferents metodologies, així com una anàlisi estructural que ha permès establir relacions d'estructura - funció.ⁱⁱⁱ A continuació es detallen els aspectes més rellevants del mecanisme enzimàtic i de l'estructura de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus*.

I.4.1. Mecanisme Enzimàtic

El mecanisme enzimàtic de la 1,3-1,4- β -glucanasa, segueix el mecanisme general de doble desplaçament per a les glicosil hidrolases amb retenció de configuració del carboni anomèric. Aquest mecanisme ha estat àmpliament detallat a l'apartat I.1.3.

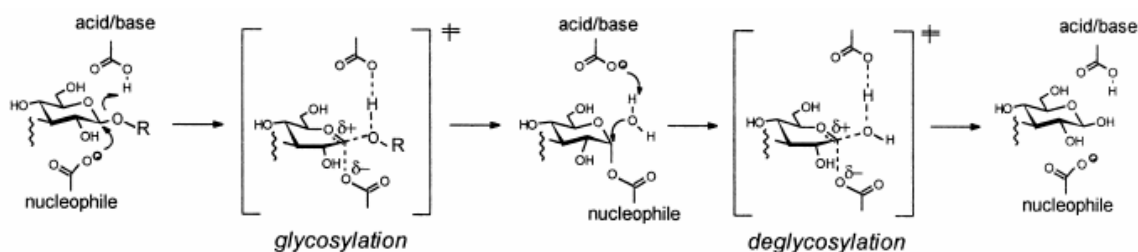


Figura I.16. Resum del mecanisme enzimàtic de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus*.

Un estudi exhaustiu de mutagènesi dirigida sobre les 1,3-1,4- β -glucanases de *Bacillus*^{50, 51}, conjuntament amb assaigs de rescat químic⁵² va permetre establir els residus catalítics essencials per a la catàlisi i assignar a cada un d'ells la seva activitat com a nucleòfil per una banda, i com a àcid/base general per l'altra. La numeració del residu que es farà servir en la present tesi correspon a l'estructura del complex enzim-producte⁴⁹. Segons aquesta numeració, el residu nucleòfil és el residu Glu105 i el residu àcid/base general el residu Glu109.

I.4.2. Estructura

De les diferents topologies presents en les glicosil hidrolases (veure Figura I.1), les 1,3-1,4- β -glucanases de *Bacillus* pertanyen al grup en forma de fissura, la qual cosa, li confereix activitat *endo*.

ⁱⁱⁱ una major discussió en profunditat d'aquest enzim, des de la codificació del seu gen, clonació i expressió, fins a estudis estructurals i funcionals, així com d'enginyeria de proteïnes, es troba a la referència 47.

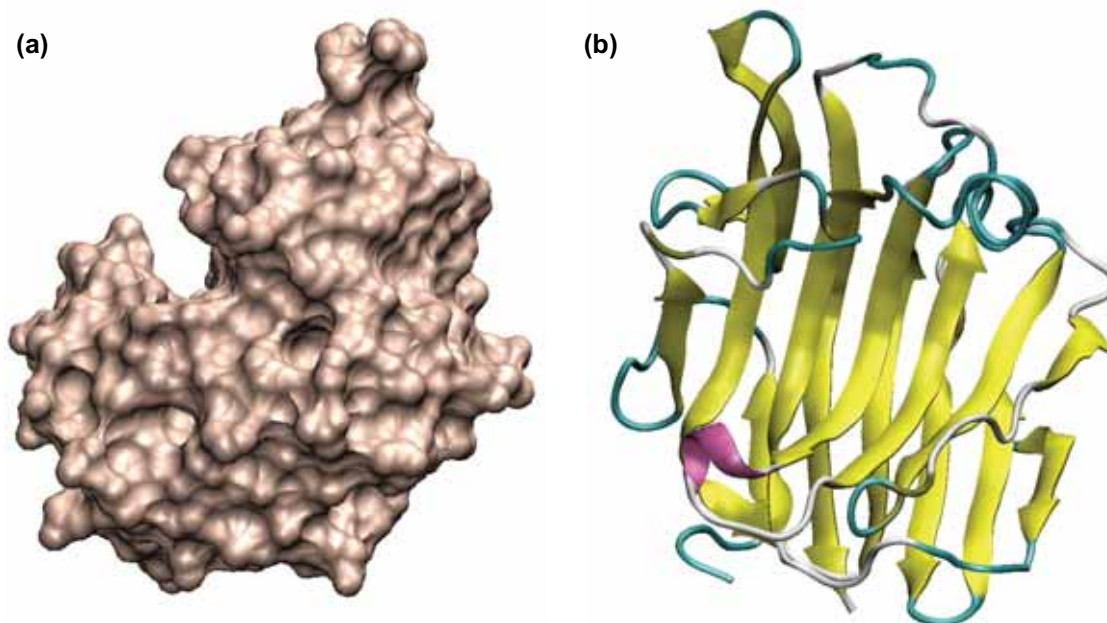


Figura 1.17. (a) Topologia del centre actiu en forma de fissura, i **(b)** estructura terciària de la *Bacillus Macerans* 1,3-1,4- β -glucanasa.

El plegament de la proteïna és de tipus *jellyroll* β -*sandwich*, constituïda per un seguit de fulles beta intercalades a través de diferents *loops* i girs. Tanmateix, una petita zona està estructurada en forma d'hèlix α . Actualment es disposa de tres estructures cristal·logràfiques de la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus*. La de l'enzim lliure publicada l'any 1993 per *Keitel* i col.⁵⁵ i per *Hahn* i col.⁵⁶ l'any 1995. La del complex covalent enzim-inhibidor amb un sacàrid epoxibutil publicada l'any 1993 per *Keitel* i col.⁵⁵, i una darrera estructura del complex enzim-producte (E·P) publicada recentment⁴⁹. En aquestes estructures, la presència d'un ió calci en el seu lloc d'unió, és essencial de cara a assegurar l'estabilitat del plegament de la proteïna.

L'estructura del complex E·P ha estat emprada com a estructura de partida en les modelitzacions moleculars portades a terme en aquesta tesi (Figura 1.18). Aquestes simulacions requereixen de la construcció prèvia de models del complex enzim-substrat. A la secció III.2.1 es detallarà la construcció d'aquests models. El substrat que s'ha emprat és un 4-metilumbeliferil (MU) tetrasacàrid. Aquest és un substrat emprat àmpliament en diferents estudis cinètics donada la seva resposta a la llum ultraviolada^{47,48,53}.

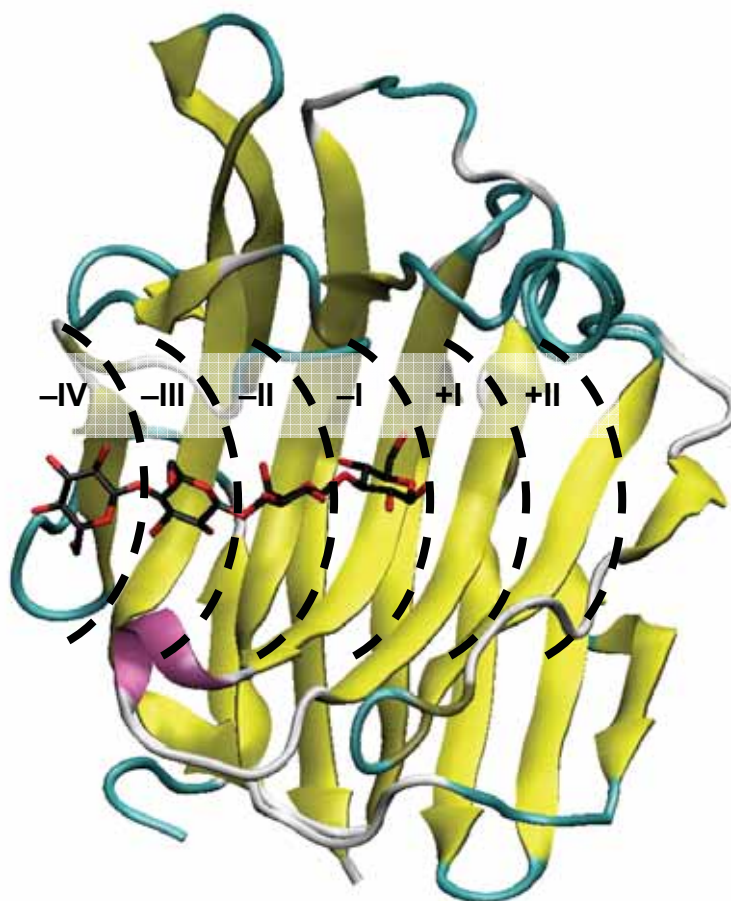


Figura I.18. Estructura del complex E·P. El tetrasacàrid ocupa els subsetis -IV a -I.

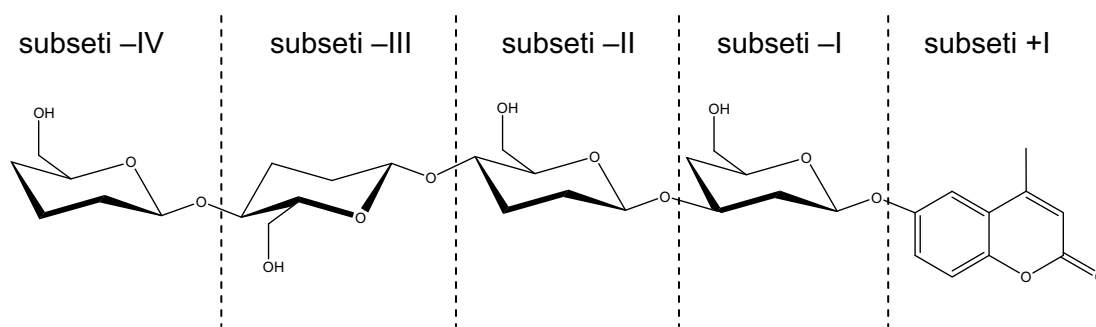


Figura I.19. Estructura de 4-metilumbeliferil-tetra- β -D-glucopiranososa emprada com a substrat en els models de complex enzim-substrat de la 1,3-1,4- β -glucanasa.

La cavitat enzimàtica de la 1,3-1,4- β -glucanasa en forma de fissura es pot dividir en 6 subsetis diferents (subseti -IV, -III, -II, -I, +I, +II). Cada una d'aquests subsetis acomoda una unitat de sacàrid diferent de la cadena del substrat. L'enllaç glicosídic que s'ha d'hidrolitzar es situa entre els subsetis -I i +I. En els models emprats en la present tesi, el substrat ocupa els subsetis -IV a +I, situant-se l'aglicó (MU) en el subseti +I (veure Figura I.19).

I.4.3. Interaccions Enzim – Substrat

Una anàlisi completa per mitjà de mutagènesi dirigida de tots els residus que possiblement interactuen amb el substrat s’ha portat a terme també per la glucanasa de *Bacillus*⁴⁷. D’aquesta manera es pot dibuixar un esquema d’aquestes interaccions tal com es mostra a la Figura I.20.

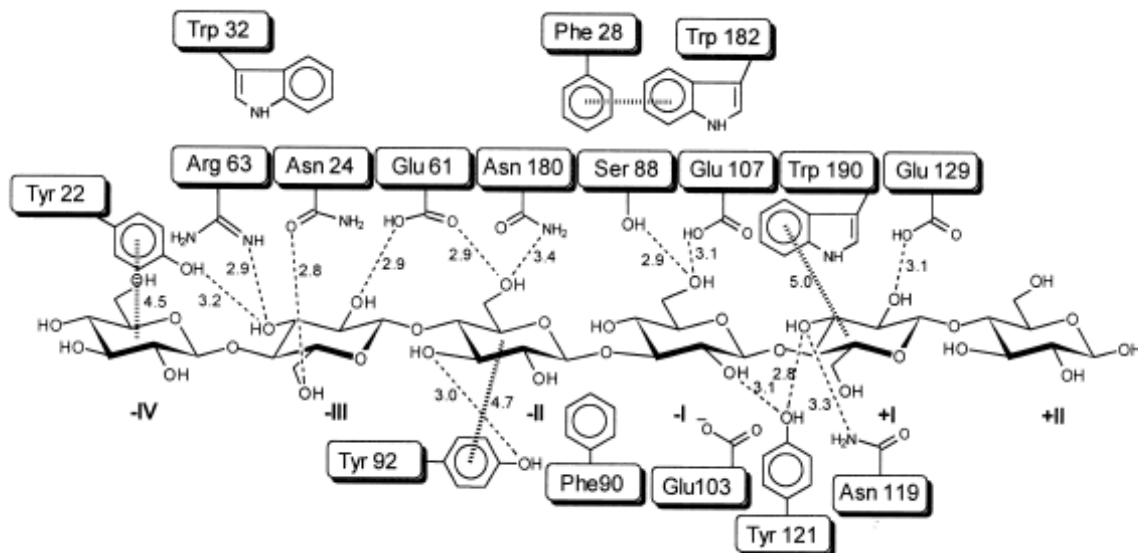


Figura I.20. Representació esquemàtica del model d’interaccions entre enzim i substrat.

Les interaccions més importants que s’estableixen entre l’enzim i el substrat són les de tipus pont d’hidrogen, tot i que també existeixen interaccions tipus *stacking* (molt comuns en GHs¹⁹) que s’estableixen entre els hidrògens alifàtics dels anells de carbohidrat i alguns residus aromàtics de l’entorn enzimàtic. Aquests tipus d’interaccions seran tingudes en compte en el disseny de les simulacions de dinàmica molecular dutes a terme al llarg de la present tesi.

I.5. Preguntes Obertes

En base a tot el que s'ha anat comentant en aquest capítol introductori, es poden resumir les principals preguntes obertes sobre la formació del complex de *Michaelis* en la 1,3-1,4- β -glucanasa, així com dels mecanismes de preactivació de substrat en β -glicosil hidrolases en general:

– **quina és la conformació que adopta el substrat en unir-se a l'enzim?**

Per a la 1,3-1,4- β -glucanasa, no es disposa de l'estructura cristal·logràfica del complex de *Michaelis*. Seria interessant veure si el substrat també adopta una conformació distorsionada similar a la present en altres β -GHs.

– **quines interaccions s'estableixen en els subetis –I i +I entre l'enzim i el substrat?**

Si bé les anàlisis mutacionals han permès establir les interaccions enzim ··· substrat que defineixen l'especificitat per substrat, sembla que a més l'enzim dirigeix el substrat cap a una estructura propera a la de l'estat de transició, a fi de facilitar el camí de reacció. Però no resta clar quins residus estan involucrats en aconseguir aquest efecte.

– **quin és el camí d'entrada del substrat a la cavitat de la 1,3-1,4- β -glucanasa?**

Quins són els mecanismes que dicten l'especificitat per substrat d'aquest enzim? Com modula l'enzim l'entrada del substrat?

– **és possible definir un model general d'unió enzim - substrat?**

La unió distorsionada del substrat a qualsevol glicosil hidrolasa és universal? Seria interessant poder predir quins canvis conformacionals sofriria un substrat determinat en unir-se a una GH concreta.

– **quines altres implicacions mecanístiques té una distorsionada del substrat?**

Les conformacions distorsionades del substrat trobades en diferents GHs satisfan els requeriments geomètrics segons la teoria estereoelectrònica (ALPH) per a una catàlisi eficient. Però hi ha alguna altra implicació favorable?

– **quina és la influència de les propietats intrínseques del substrat?**

Hi ha alguna relació entre les conformacions concretes del substrat preferides per diferents GHs i les propietats de les diferents conformacions presents en solució. Hi ha propietats que canvien quan es produeixen canvis conformacionals del substrat? Quines característiques justifiquen la selecció preferent per part de les GHs?

– **quin és l'itinerari conformacional del substrat al llarg de la reacció enzimàtica?**

Per a les glucosidases, se'ls ha proposat un itinerari conformacional de reacció enzimàtica de tipus ${}^1S_3 \leftrightarrow {}^4H_3 \leftrightarrow {}^4C_1$. És vàlid aquest model per a la 1,3-1,4- β -glucanasa (família 16)? Quins canvis estructurals s'observen al llarg de la reacció?

– **quina és l'estructura de l'estat de transició de la reacció enzimàtica?**

L'estructura de l'estat de transició no es pot obtenir directament dels experiments. La modelització teòrica permetrà extreure informació estructural dels diferents estadis de reacció, no només de reactius i productes, sinó també de l'estat de transició.

Objectius

Amb la present tesi es pretén contribuir a determinar les bases de la preactivació del substrat en β -glicosil hidrolases en general i en la *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanasa en particular. Els objectius principals són els següents:

- **Crear un model computacional per al complex enzim – substrat en 1,3-1,4- β -glucanasa.**
- **Determinar l'estructura que adopta el substrat en unir-se a l'enzim i discernir si és l'única estructura estable, o bé si és possible assolir altres conformacions.**
- **Investigar el camí d'entrada del substrat a la cavitat enzimàtica de la 1,3-1,4- β -glucanasa a fi de determinar els mecanismes de reconeixement del substrat.**
- **Determinar les principals interaccions que s'estableixen entre l'enzim i el substrat, i trobar els factors responsables de la conformació del substrat.**
- **Establir les implicacions que té una unió distorsionada del substrat a l'enzim de cara a la reacció enzimàtica.**
- **Determinar si existeix alguna relació entre les conformacions distorsionades del substrat presents en diferents β -glicosidases i les propietats de les diferents conformacions d'un anell de β -D-glucopiranososa.**
- **Investigar la reacció enzimàtica de la 1,3-1,4- β -glucanasa a fi de determinar l'estructura dels diferents estadis de la reacció, i de validar els mecanismes de preactivació del substrat establerts anteriorment.**

