



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 VIII

Resum Final i Conclusions

La modelització molecular portada a terme en aquesta tesi ha permès establir l'estructura del complex de *Michaelis* de la 1,3-1,4- β -glucanasa. La modelització teòrica permet emprar un substrat natural en un enzim natiu, sense necessitat de recórrer a inhibidors ni a mutants de l'enzim. Les diferents simulacions, basades en dinàmica molecular, mostren que el substrat s'hi uneix preferentment en una conformació distorsionada. La utilització mètodes de primers principis ha permès avaluar diferents propietats estructurals i electròniques del substrat. D'altra banda, mitjançant tècniques d'acceleració d'esdeveniments (metadinàmica), s'han portat a terme simulacions de processos que altrament suposarien un elevat cost computacional. Així, ha estat possible simular reversiblement el procés d'entrada del substrat des de la solució a la cavitat enzimàtica de la 1,3-1,4- β -glucanasa, podent establir els mecanismes de reconeixement del substrat per part d'aquest enzim.

En aquesta tesi, s'ha analitzat les implicacions mecanístiques que té una unió distorsionada del substrat en β -glicosil hidrolases i en la 1,3-1,4- β -glucanasa en particular. A part de les característiques estructurals ja apuntades per diferents autors^{4,25} (axialitat de l'enllaç glicosídic), l'anàlisi, mitjançant mètodes de primers principis, de totes les conformacions possibles d'un anell de β -D-glucopiranososa mostra que aquelles conformacions reconegudes per diferents β -glucosil hidrolases s'aproximen (des d'un punt de vista estructural i de reorganització electrònica) a l'estat de transició de la reacció d'hidròlisi. Així doncs, el substrat, en unir-se a aquest enzims, queda preactivat de cara a la reacció enzimàtica.

L'important separació de càrregues que té lloc al llarg del primer pas de la reacció enzimàtica de hidròlisi ha quedat demostrada mitjançant la simulació d'aquest primer pas de reacció. Per la seva banda, l'estructura de l'estat de transició concorda amb els resultats experimentals que prediuen que aquest és de tipus oxocarbocatiònic.

CONCLUSIONS

Les conclusions a les que s'ha arribat en el desenvolupament d'aquesta tesi són:

- el substrat s'uneix preferentment a la 1,3-1,4- β -glucanasa de manera distorsionada en una conformació intermèdia tipus ${}^1S_3 / boat$ ${}^{1,4}B$. El canvi conformacional del substrat té lloc durant el procés d'entrada, essent altament improbable una interconversió amb la conformació 4C_1 un cop el substrat està unit al centre catalític.
- per modelar el complex de *Michaelis* en β -glicosidases, és convenient tractar quànticament el centre actiu, tenint en compte l'efecte de l'entorn proteic, donada la dificultat dels camps de forces estàndard en descriure les transicions conformacionals del substrat.
- els residus de l'entorn catalític modulen les conformacions que pot assolir el substrat. En particular, la topologia de la cavitat enzimàtica i el conjunt d'interaccions establertes en el subseti +I són les responsables de mantenir la conformació distorsionada del substrat, forçant l'orientació axial de l'enllaç glicosídic.
- l'anell de β -D-glucopiranososa en fase gas presenta una elevada flexibilitat conformacional, que es veu restringida en unir-se a l'enzim. Intrínsecament, les conformacions distorsionades d'aquest anell presenten canvis d'estructura interna i reorganitzacions electròniques respecte la conformació cadira 4C_1 .
- les glucosil hidrolases seleccionen preferentment aquelles conformacions del substrat que, des d'un punt de vista estructural i electrònic, són el més semblant possibles a l'estat de transició de la reacció enzimàtica.
- en el cas particular de la 1,3-1,4- β -glucanasa, la unió distorsionada del substrat en una conformació intermèdia tipus ${}^1S_3 / {}^{1,4}B$ accentua encara més la reorganització electrònica del substrat, aproximant-lo més a l'estat de transició de la reacció enzimàtica.
- un substrat tipus 2-desoxi-derivat (generalment inhibidor en altres GHs) manté l'activitat catalítica en 1,3-1,4- β -glucanasa donat que assoleix una conformació alternativa en la que té el mateix esquema d'interaccions amb l'entorn catalític respecte del substrat natural. L'itinerari conformacional del substrat 2-desoxi al llarg de la reacció enzimàtica seria de tipus ${}^2S_0 \rightarrow {}^{2,5}B \rightarrow {}^4C_1$.

-
- un lligands tipus 2-fluoro-derivat (emprat comunament en la resolució d'estructures cristal·logràfiques del complex de *Michaelis* de GHs) manté la mateixa conformació que la del substrat natural en la 1,3-1,4- β -glucanasa.
 - al llarg del primer pas de la reacció enzimàtica de la 1,3-1,4- β -glucanasa, el substrat presenta un itinerari conformacional tipus ${}^1S_3/{}^1,4B \rightarrow {}^4H_5/{}^4H_3 \rightarrow {}^4C_1$. Aquest itinerari conformacional pot ser predit a través del mapa d'energia lliure conformacional del substrat en la cavitat enzimàtica.
 - el mecanisme de reacció és de tipus dissociatiu, en el que el trencament de l'enllaç glicosídic s'avança respecte la protonació del grup sortint. El corresponent estat de transició és de tipus oxocarbocatiònic.
 - el mecanisme de formació del complex de *Michaelis* involucra canvis conformacionals tant del substrat com de l'enzim. Aquest procés es pot resumir com:
1) canvi d'orientació de l'aglicó, de la regió α -anomèrica a la β -anomèrica, 2) canvi conformacional del substrat ${}^4C_1 \rightarrow {}^1S_3$ i 3) tancament de la cavitat enzimàtica.

