



Universitat de Barcelona

Facultat de Química

Departament de Química Física

i

Parc Científic de Barcelona

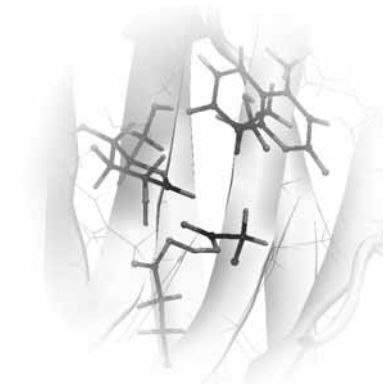
Centre especial de Recerca en Química Teòrica

**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 VI

Primer Pas de la Reacció Enzimàtica de la 1,3-1,4- β -glucanasa

VI.1. Introducció i Objectius

En els capítols anteriors de la tesi, s'ha analitzat el mode d'unió del substrat a la 1,3-1,4- β -glucanasa. La correcta unió del substrat a qualsevol enzim posiciona aquest en l'orientació adequada per a la reacció enzimàtica, a prop dels residus catalítics i establint les interaccions necessàries amb l'entorn. De fet, una component important de la catàlisi en la majoria d'enzims es deriva d'aquestes interaccions no enllaçants establertes entre l'enzim i el substrat, les quals s'optimitzen en l'estat de transició de la reacció enzimàtica. En les β -glicosidases, la unió del substrat a l'enzim ve acompanyada d'una distorsió a nivell de substrat. Per el cas de la 1,3-1,4- β -glucanasa, en el capítol III d'aquesta tesi, s'ha demostrat que el substrat s'hi uneix preferentment en una conformació distorsionada tipus ${}^1S_3/{}^1,4B$. També s'ha demostrat que aquest tipus d'unió preactiva el substrat de cara a la reacció enzimàtica, ja que l'estructura i la distribució de càrregues del substrat són properes a la de l'estat de transició de la reacció enzimàtica proposat per a les β -glicosidases en general.

Tal i com s'ha detallat al capítol introductori (secció I.1.3), les β -glicosidases que actuen amb retenció de configuració (com la 1,3-1,4- β -glucanasa) operen a través d'un mecanisme de doble desplaçament¹ com el mostrat a la Figura VI.1.

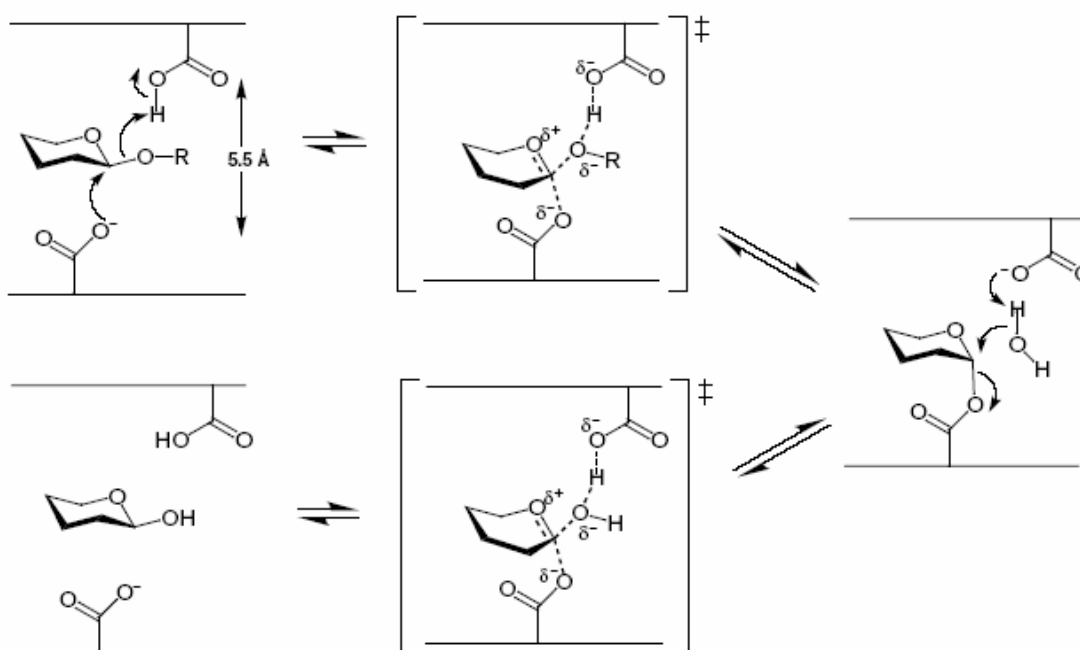


Figura VI.1. Mecanisme enzimàtic de les glicosidases que actuen amb retenció de configuració.²

PRIMER PAS DE LA REACCIÓ ENZIMÀTICA

En el primer pas de reacció (glicosilació) el residu que actua com a àcid general protona l'oxigen glicosídic amb el conseqüent trencament de l'enllaç glicosídic per acabar generant l'intermedi covalent glicosil–enzim que és estabilitzat per mitjà del residu nucleòfil. El segon pas de reacció (desglicosilació) involucra l'atac d'una molècula d'aigua assistida per la base conjugada del residu àcid general, generant així el producte de hidròlisi amb retenció de configuració en el carboni anomèric. Mesures d'efectes cinètics isotòpics secundaris de deuteri sobre l'hidrogen del carboni anomèric del substrat, mostren que ambdós passos de reacció tenen lloc a través d'un estat de transició de tipus oxocarbocatiònic⁸.

Aquest mecanisme enzimàtic de doble desplaçament està àmpliament acceptat per a les β -glicosidases que actuen amb retenció de configuració. Amb tot, durant anys ha existit la disputa intel·lectual sobre si la lisosima de la clara d'ou (HEWL^{4,15-17,26}) seguia aquest tipus de mecanisme o bé un mecanisme que no involucrés la formació d'un intermedi¹⁷. En particular, es va proposar que l'estructura oxocarbocatiònica podria estabilitzar-se com a un intermedi de reacció¹⁷. Així, a nivell teòric, *Warshel i Leivitt*⁸³ proposaren que l'estructura oxocarbocatiònica desenvolupada al llarg de la reacció enzimàtica de la HEWL s'estabilitza mitjançant interaccions electrostàtiques amb l'entorn. D'altra banda, *Post i Karplus*, mitjançant càlculs de dinàmica molecular, van proposar un mecanisme de reacció alternatiu, en el que tindria lloc una obertura de l'anell glucopiranosídic a través de l'enllaç endocíclic C1–O5 abans de la hidròlisi de l'enllaç glicosídic⁸⁴. Recentment, *de Vivo i col.* han realitzat un estudi sistemàtic d'aquestes propostes mecanístiques mitjançant DFT en models en fase gas⁸⁵. Els resultats indiquen que el mecanisme de reacció a través de la formació d'un intermedi covalent és el més favorable cinèticament, encara que el mecanisme a través de l'obertura de l'anell també pot ser competitiu. Els autors, en canvi, no troben evidències de la formació d'un intermedi de reacció de tipus oxocarbocatiònic en la HEWL.

Recentment s'ha demostrat a nivell experimental que la lisosima opera a través d'un intermedi covalent¹⁸ com en la resta de glicosidases. Un itinerari de reacció amb un intermedi de tipus oxocarbocatiònic sembla ara relegat només al cas de la uracil–DNA glicosidasa ja que per a aquest enzim s'ha demostrat computacionalment, mitjançant mètodes semiempírics (AM1) en un model QM/MM, que el mateix substrat estabilitza l'oxocarbocatió⁸⁶ en un intermedi de reacció.

D'altra banda, la determinació estructural de diferents β -glicosidases per cristal·lografia de raigs X emprant substrats modificats o mutacions locals de l'enzim ha permès observar que el substrat adopta conformacions diferents al llarg del primer pas de la reacció enzimàtica³⁵. Així s'ha proposat²⁵ que en les famílies 5, 7 18 i 20 el substrat segueix un itinerari conformacional tipus 1S_3 (complex de *Michaelis*) \rightarrow 4H_3 (estat de transició) \rightarrow 4C_1 (intermedi covalent glicosil-enzim) i la família 26 segueix un itinerari tipus ${}^1S_5 \rightarrow B_{2,5} \rightarrow {}^2S_0$. Al capítol anterior s'ha proposat que, per a la 1,3-1,4- β -glucanasa de la família 16, el substrat segueix un itinerari conformacional de tipus ${}^1S_3/{}^1,4B \rightarrow {}^4H_5 \rightarrow {}^4C_1$ al llarg del primer pas de reacció. Aquesta proposta s'ha fet en base al mapa d'energia lliure conformacional del substrat en la cavitat enzimàtica. En aquest capítol, es modelitzarà el primer pas de la reacció d'aquest enzim a fi de comprovar la validesa d'aquesta hipòtesi.

La modelització del primer pas de reacció enzimàtica de la 1,3-1,4- β -glucanasa amb el substrat metilumbeliferil-tetrasacàrid es portarà a terme mitjançant el mètode QM/MM-CPMD acoblat a metadinàmica. Aquesta modelització permetrà seguir els canvis conformacionals del substrat al llarg de la reacció, així com els canvis electrònics que hi tenen lloc. Es podrà, doncs, determinar l'estructura de l'estat de transició i de l'intermedi de reacció a fi de comprovar que es tracti d'un intermedi covalent i d'un estat de transició de tipus oxocarbocatònic. Així mateix, s'obtéindrà el mapa d'energia lliure associat al primer pas de la reacció enzimàtica.

VI.2. Detalls Computacionals

VI.2.1. Estructura de Partida i Model Teòric

L'estructura de partida emprada per a la simulació ha estat la del complex de *Michaelis* de la 1,3-1,4- β -glucanasa obtinguda anteriorment (capítol III). En aquesta, el substrat adopta una conformació distorsionada tipus *skew* 1S_3 / *boat* 1,4B (veure Figura VI.2). En la conformació inicial el residu nucleòfil (Glu105) està situat a 3.71 Å del carboni anomèric on ha d'efectuar l'atac, mentre que el protó del residu àcid general (Glu109) està situat a 2.19 Å de l'oxigen glicosídic on ha de ser transferit.

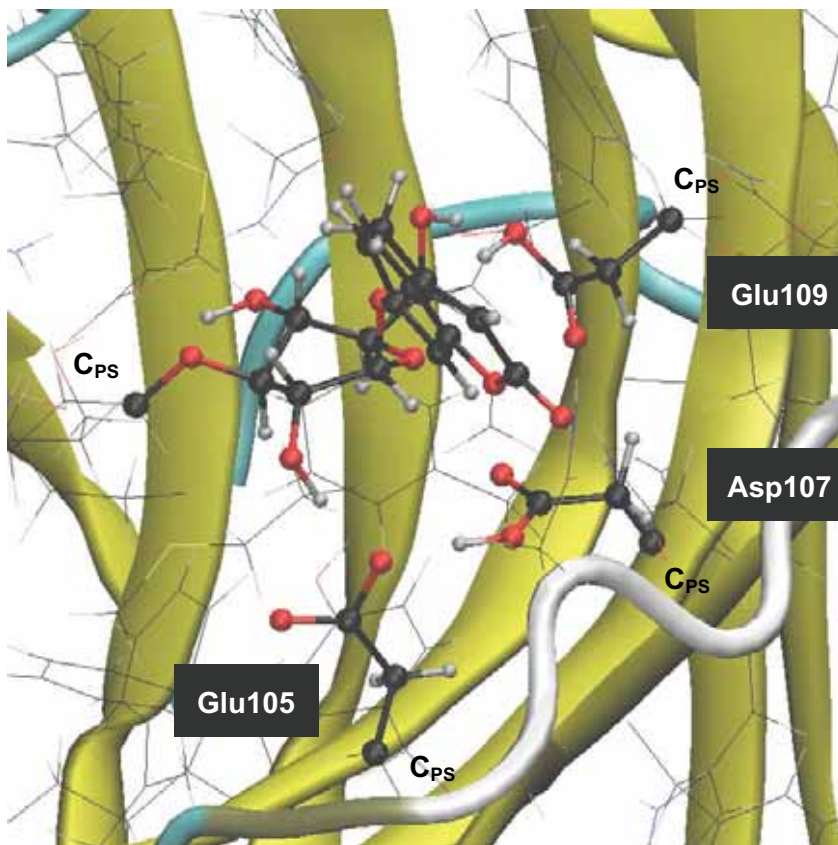


Figura VI.2. Configuració inicial del sistema per a la simulació del primer pas de reacció enzimàtica (veure text).

La partició QM/MM emprada en el càlcul és la següent:

- **regió QM:** tots aquells àtoms involucrats en el procés reactiu. En aquest cas els residus Glu105, Glu107, Glu109 conjuntament amb les unitats de substrat localitzades als subestis $-I$ i $+I$ són tractats mecanoquànticament (representació "ball & stick" de la Figura VI.2).
- **regió MM:** la resta del substrat i la resta d'aminoàcids, així com les aigües de solvatació i els contraions són tractats mitjançant el camp de forces clàssic.

VI.2.2. Paràmetres de Simulació

La dinàmica molecular s'ha realitzat emprant el mètode CPMD en l'esquema híbrid QM/MM. Per descriure la regió MM s'ha emprat el camp de forces AMBER en combinació amb el camp de forces GLYCAM/GAFF per al substrat. La regió QM ha estat descrita mitjançant DFT emprant el funcional PBE. Els paràmetres de simulació emprats es resumeixen a la Taula VI.1.

mida de la base	70 Ry	
massa electrònica	850 u.a.	
pas de simulació	5 u.a. (= 0.12 fs)	
mida de cel·la	a = 34 Å ; b = 28 Å ; c = 31 Å	
termòstat nuclear	temperatura: 300 k	frequència: 1000 cm ⁻¹
termòstat electrònic	energia cinètica: 0.017 h	frequència: 10000 cm ⁻¹
subregions electrostàtiques	R _{NN} = 10 Å ; R _{MIX} = 12 Å ; R _{ESP} = 14 Å	

Taula VI.1. Paràmetres de la simulació CPMD QM/MM.

VI.2.2.1. Definició de les Variables Col·lectives

El requisit fonamental a l'hora d'escollir una variable col·lectiva per a emprar-la en metadinàmica és que sigui capaç de discernir entre tots els estats del procés que es vol analitzar. Al llarg del primer pas de la reacció enzimàtica, es trencarà l'enllaç glicosídic (C1–O1) i es formarà l'enllaç covalent glicosil–enzim (Glu105–O–C1). Paral·lelament també tindrà lloc la transferència de protó per part del residu àcid general (Glu109) a l'oxigen glicosídic (O1), implicant el trencament de l'enllaç Glu109–O–H i la formació de l'enllaç H–O1. Les variables col·lectives emprades tenen en compte aquests trencaments i formacions d'enllaços.

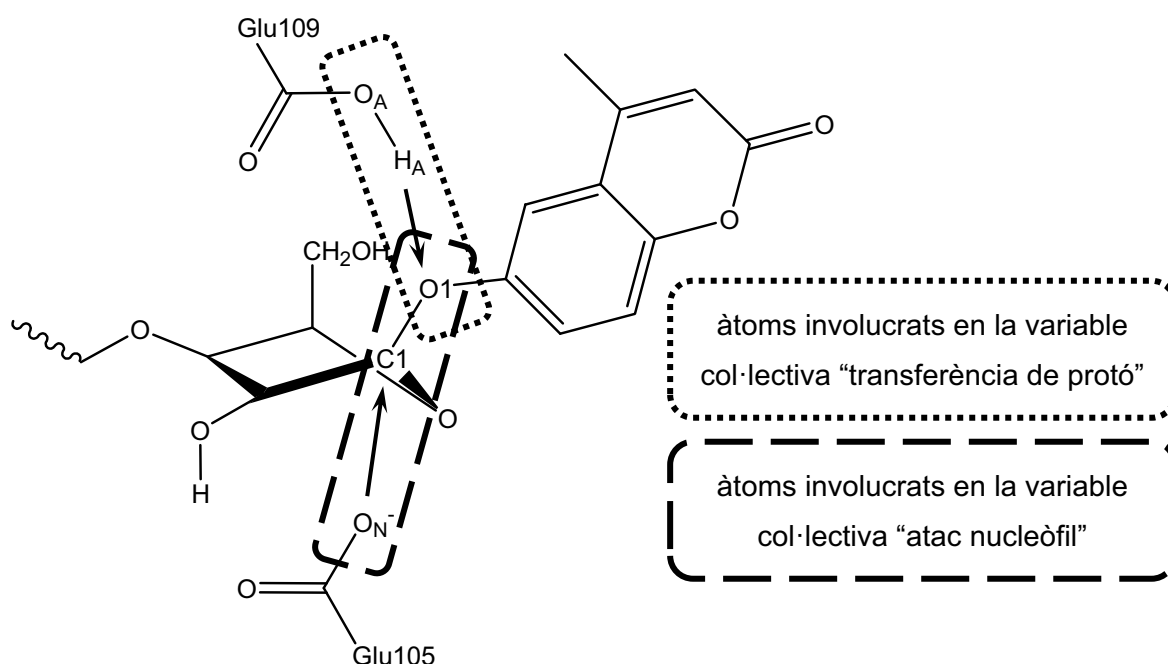


Figura VI.3. Àtoms involucrats en la definició de les variables col·lectives.

PRIMER PAS DE LA REACCIÓ ENZIMÀTICA

La primera variable col·lectiva representa l'atac nucleòfil per part del residu Glu105 sobre el carboni anomèric. Aquesta està definida com la diferència entre l'índex de coordinació del carboni anomèric (C1) amb l'oxigen del grup entrant (Glu105-O_N) i l'índex de coordinació de C1 amb l'oxigen del grup sortint (O1-MU). La segona variable col·lectiva representa la transferència del protó per part del residu Glu109 a l'oxigen glicosídic (O1). Aquesta està definida com la diferència entre l'índex de coordinació del protó del residu àcid general (H_A) amb el corresponent oxigen (Glu109-O_A) i l'índex de coordinació de H_A amb l'oxigen glicosídic (O1).

Els índexs de coordinació són un formulisme matemàtic comunament emprat en metadinàmica. Aquests permeten definir la presència o no presència d'un enllaç entre dos àtoms, en base a una distància llindar (d_0). Si la distància entre aquests dos àtoms (d) és major que la distància llindar, l'índex de coordinació val 0 (no hi ha enllaç). Si la distància és menor, l'índex de coordinació val 1 (hi ha enllaç). Definit d'aquesta manera la variable col·lectiva seria discreta. Per tal de convertir-la en una variable contínua (requisit per implementar-la com a variable col·lectiva en metadinàmica) s'utilitza el següent formulisme matemàtic:

$$\text{índex de coordinació (ic)} = \frac{1 - \left(\frac{d}{d_0}\right)^p}{1 - \left(\frac{d}{d_0}\right)^q} \quad \text{eq.25}$$

D'aquesta manera, la variable col·lectiva és contínua i pren una forma similar al mostrat a la Figura VI.4. La major o menor curvatura en passar de 0 a 1 s'aconsegueix ajustant els paràmetres p i q .

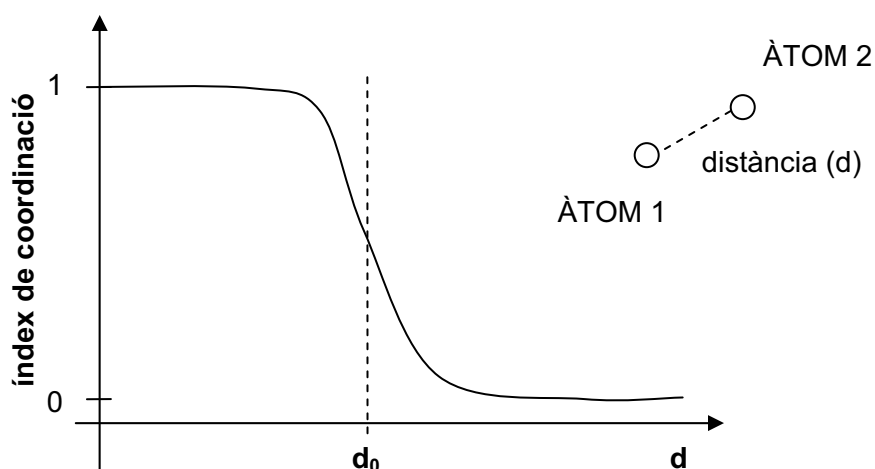


Figura VI.4. Representació de la funció índex de coordinació.

En aquest cas, com a variable col·lectiva s'ha emprat una diferència d'índex de coordinació. Això permet seguir els canvis en la coordinació d'un àtom central respecte els àtoms de l'entorn. Per exemple, per l'atac nucleòfil, el carboni anomèric està inicialment coordinat a l'oxigen glicosídic. En el decurs de la reacció aquesta coordinació s'anirà perdent i el carboni anomèric s'anirà coordinant a l'oxigen del residu nucleòfil (Glu105). Els paràmetres p , q i d_0 de la diferència d'índexs de coordinació s'han ajustat de tal manera que en l'estat inicial (complex de *Michaelis*) la variable col·lectiva pren el valor de -0.8, i en l'estat final (intermedi de reacció) pren el valor de 0.8. En l'estat intermedi, la variable col·lectiva pren el valor de -0.2. La transferència de protó s'ha definit de manera anàloga. A la Taula VII.1 es recull el llistat d'àtoms que formen part cada variable col·lectiva, així com dels paràmetres emprats per definir la funció d'índex de coordinació.

variable col·lectiva	àtom central	àtoms de coordinació	distància llindar	paràmetre	
				p	q
atac nucleòfil	C1	O _A (Glu109) O1	1.6 Å	12	14
transferència de protó	H _a (Glu109)	O _N (Glu105) O1	1.1 Å	12	14

Taula VI.2. Llistat d'àtoms i paràmetres involucrats en les variables col·lectives.

VI.2.2.2. Paràmetres del Potencial Històric

Tal com s'ha descrit anteriorment, l'activació de la reacció mitjançant metadinàmica té lloc a través de l'acumulació d'un potencial històric que prevé el sistema de tornar a visitar les zones de l'espai ja visitades. Aquest potencial històric es construeix en base a termes de tipus gaussià, pels quals cal definir una alçada i una amplada. Els criteris per a establir aquest paràmetres ja han estat discutits anteriorment (secció IV.2.3.2). A la Taula VII.2 es recullen els paràmetres del potencial històric emprats en la simulació del primer pas de reacció. Al final de la simulació, la superfície d'energia lliure del procés podrà ser reconstruïda en base a la suma de tots els termes gaussians afegits al potencial històric.

PRIMER PAS DE LA REACCIÓ ENZIMÀTICA

variable col·lectiva	amplada de les gaussianes	alçada de les gaussianes	temps de relaxació
atac nucleòfil	0.15	0.94 – 1.88 kcal·mol ⁻¹	200 passos de dinàmica
transferència de protó	0.15		

Taula VI.3. Paràmetres del potencial històric emprats en la metadinàmica.

VI.3. Resultats i Discussió

A partir de l'estructura equilibrada del complex de *Michaelis* s'ha iniciat la simulació de la reacció enzimàtica mitjançant dinàmica molecular híbrida CPMD QM/MM combinada amb metadinàmica. Ha calgut allargar la simulació durant 15.84 ps per tal de completar el primer pas de reacció. Durant aquest temps, ha tingut lloc el trencament de l'enllaç glicosídic i la formació de l'intermedi covalent. A continuació es descriu en primer lloc la trajectòria obtinguda al llarg de la simulació, fent èmfasi als canvis conformacionals del substrat. En segon lloc es descriu el mapa d'energia lliure obtingut del mateix càlcul, analitzant el tipus de mecanisme observat per a aquesta reacció. Finalment s'analitza l'estructura de l'estat de transició de la reacció enzimàtica i es detallen els canvis estructurals i electrònics que tenen lloc al llarg de la reacció.

VI.3.1. Trajectòria de Reacció

La simulació s'ha iniciat a partir de la conformació ¹S₃/^{1,4}B del substrat^{ix}. Durant la simulació de metadinàmica, el procés de transferència protònica del residu àcid base general (Glu109) a l'oxigen de l'enllaç glicosídic (O1), així com l'atac nucleòfil sobre el carboni anomèric (C1) per part del residu Glu105 es veuen accelerats. A la Figura VI.5 es mostra l'evolució de les variables col·lectives al llarg de la simulació. També s'hi mostren quatre estructures representatives de la simulació en els diferents estadis de la reacció enzimàtica.

^{ix} cal recordar que la *conformació del substrat* fa referència a la conformació que adopta l'anell de glucopiranososa situat al subseti -I de la cavitat enzimàtica.

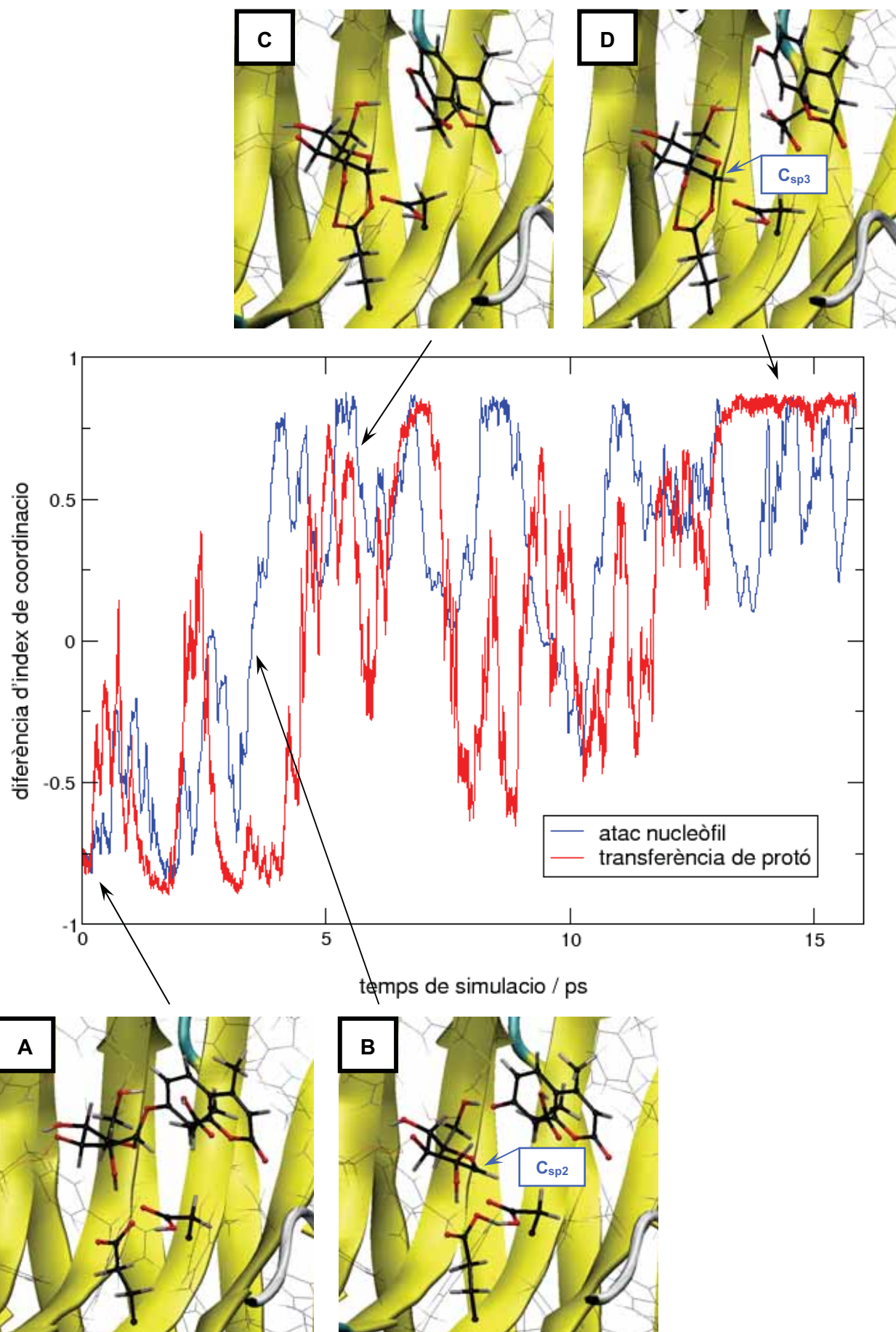


Figura VI.5. Evolució de les variables col·lectives durant la simulació i estructures representatives.

PRIMER PAS DE LA REACCIÓ ENZIMÀTICA

La simulació comença quan el residu nucleòfil (Glu105) encara està lluny del carboni anomèric (C1) i el residu àcid base general (Glu109) forma una interacció per pont d'hidrogen amb el substrat (O1). A mesura que evoluciona la metadinàmica, l'amplitud en les oscil·lacions de les variables col·lectives va augmentant, fruit de l'acumulació de termes gaussians en el potencial històric. Al cap de 3.47 ps es produeix la primera transició en la variable col·lectiva representativa de l'atac nucleòfil. En aquest punt l'enllaç glicosídic ja s'ha trencat, sense necessitat de protonar el grup sortint. Al cap de 4.58 ps, té lloc la transició en la variable col·lectiva representativa de la transferència de protó. En aquest punt s'ha completat la transferència de protó cap a l'aglicó. Tal com s'observa a la Figura VI.5-B, un cop es trenca l'enllaç glicosídic es produeix un canvi d'hibridació en el carboni anomèric (C1). Els àtoms C2, C1, H1, O5, C5 es disposen ara de manera coplanar, indicatiu de la hibridació sp^2 del carboni anomèric. Això repercuteix en un canvi conformacional del substrat, el qual fluctua al voltant d'una conformació tipus 4H_3 . Més endavant, aquesta estructura serà analitzada en detall. A continuació, el sistema evoluciona cap a l'intermedi covalent, formant-se l'enllaç entre el residu nucleòfil i el carboni anomèric. En aquest punt, el substrat canvia novament de conformació adoptant la conformació cadira 4C_1 (Figura VI.5-C). L'intermedi covalent glicosil-enzim es manté relativament estable per la resta de la simulació, mentre que l'aglicó roman lliure en la cavitat enzimàtica. Al cap de 15.84 ps de simulació, el sistema ha explorat tot l'espai de fases d'interès.

VI.3.1.1. Itinerari Conformacional del Substrat

Per tal de seguir els canvis conformacionals del substrat al llarg de la reacció enzimàtica, s'ha calculat les coordenades d'empaquetament cartesianes del substrat al llarg de la simulació (coordenades qx i qy definides al capítol IV) i s'han situat sobre el diagrama de *Stoddart* (Figura VI.6). Els resultats mostren que l'itinerari conformacional del substrat al llarg de la reacció és de tipus ${}^1S_3 \rightarrow {}^4H_3 \rightarrow {}^4C_1$ com l'observat per a les famílies 5, 7 18 i 20 de les β -GHS²⁵. Així mateix, a la Figura VI.6, la projecció de la trajectòria sobre el diagrama de *Stoddart* es superposa amb el mapa d'energia lliure conformacional del substrat en la cavitat enzimàtica obtingut en el capítol anterior (secció V.3.2 a la pàgina 127).

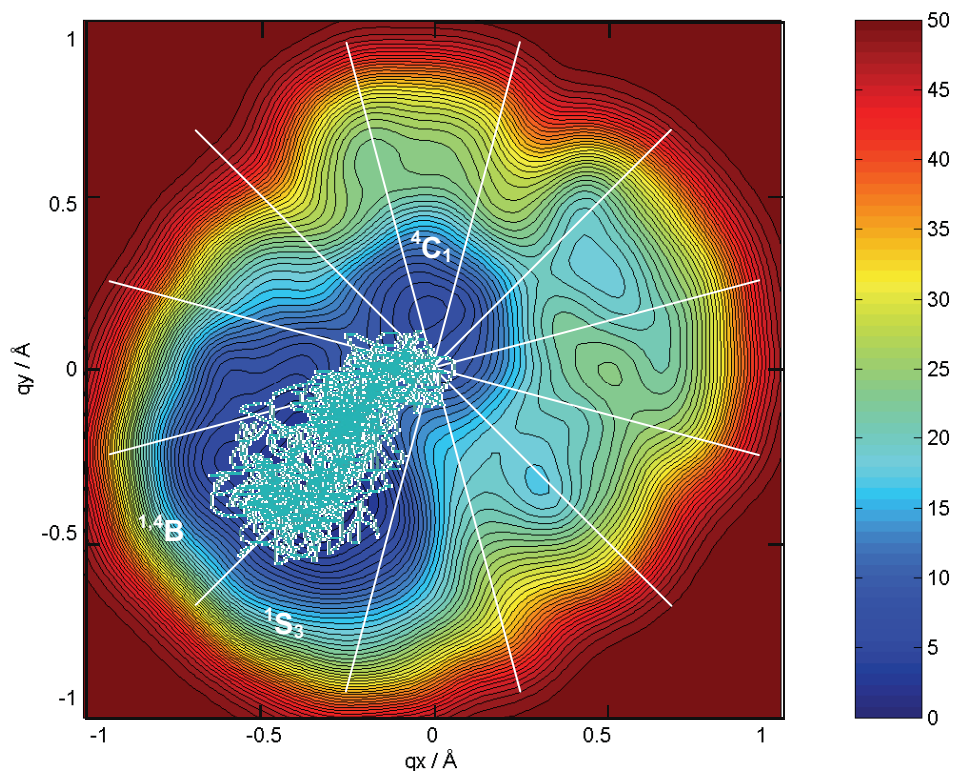


Figura VI.6. Superposició de l'itinerari conformacional seguit pel substrat durant el primer pas de la reacció enzimàtica amb el mapa d'energia lliure conformacional del substrat.

Al capítol V s'havia proposat que l'itinerari conformacional seguit pel substrat al llarg de la reacció seria del tipus $^1S_3 \rightarrow ^4H_5 \rightarrow ^4C_1$. Aquesta proposta s'havia fet en base al mapa d'energia lliure conformacional del substrat un cop unit a l'enzim. Tal com es pot veure a la Figura VI.6, la proposta era correcta, ja que l'itinerari conformacional del substrat durant la reacció passa a través del camí de mínima energia que connecta les conformacions 1S_3 i 4C_1 en el diagrama conformacional. Una conseqüència important d'això és que el mapa d'energia lliure conformacional del substrat en la cavitat enzimàtica pot ser emprat orientativament per conèixer l'itinerari conformacional del mateix substrat durant la reacció enzimàtica.

VI.3.2. Mapa d'Energia Lliure de Reacció

A la Figura VI.7 es mostra la superfície d'energia lliure associada al primer pas de la reacció enzimàtica en funció de les diferències d'índexs de coordinació que defineixen l'atac nucleòfil i la transferència de protó. Els diferents mínims estan ordenats segons l'ordre d'estabilitat ($E_{M1} < E_{M2} < E_{M3} < E_{M4}$). A la Taula VI.4 es recullen les diferències d'energia entre els punts característics de la superfície.

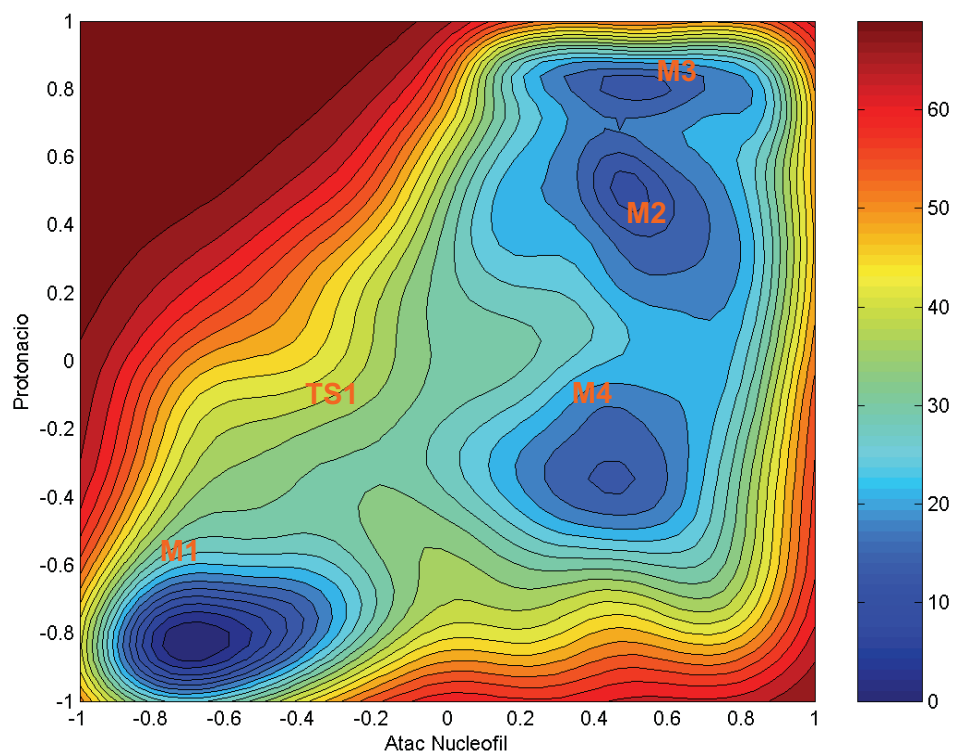


Figura VI.7. Mapa d'energia lliure corresponent al primer pas de reacció enzimàtica de la 1,3-1,4- β -glucanasa (la separació entre corbes de nivell és de 3 kcal·mol⁻¹).

mínim	atac nucleòfil	protonació	E _{rel} / kcal·mol ⁻¹
M1	-0.69	-0.83	0.0
TS1	-0.21	-0.32	31.5
M2	0.51	0.50	9.5
M3	0.52	0.80	12.5
M4	0.45	-0.32	12.5

Taula VI.4. Energies lliures relatives dels diferents punts característics del mapa d'energia lliure.

A la Figura VI.8 es mostra una representació esquemàtica de cada un dels punts característics de la superfície d'energia lliure. M1 es correspon als reactius (complex de *Michaelis*). Aquest és el mínim global d'energia de tot l'espai analitzat. Els valors negatius de les variables col·lectives en aquest punt indiquen que encara no s'ha iniciat ni l'atac nucleòfil sobre el carboni anomèric, ni la transferència de protó a l'oxigen glicosídic. Per la seva banda en M2, M3 i M4 la diferència d'índexs de coordinació corresponent a l'atac nucleòfil és més gran que 0, és a dir que en aquests tres mínims l'atac nucleòfil està completat i l'intermedi covalent glicosil-enzim està format. La diferència entre aquests tres mínims és l'estat de protonació del grup sortint. En M2 i M3 la protonació de l'aglicó és completa (la diferència d'índexs de coordinació corresponent a la protonació és més gran que 0), mentre que en M4 el protó està compartit entre l'aglicó i el residu àcid general. L'existència d'aquest mínim posa de manifest la similitud entre els pK_a del residu àcid general i del grup sortint. Segons dades experimentals⁵⁴, el pK_a de l'aglicó és 7.5, i és d'esperar que el residu àcid general tingui un pK_a similar a aquest valor donat que en el segon pas de la reacció ha d'actuar com a base general. Si l'aglicó fos de major basicitat, segurament el mínim M4 no estaria present, i l'abstracció del protó hauria tingut lloc en només trencar-se l'enllaç glicosídic.

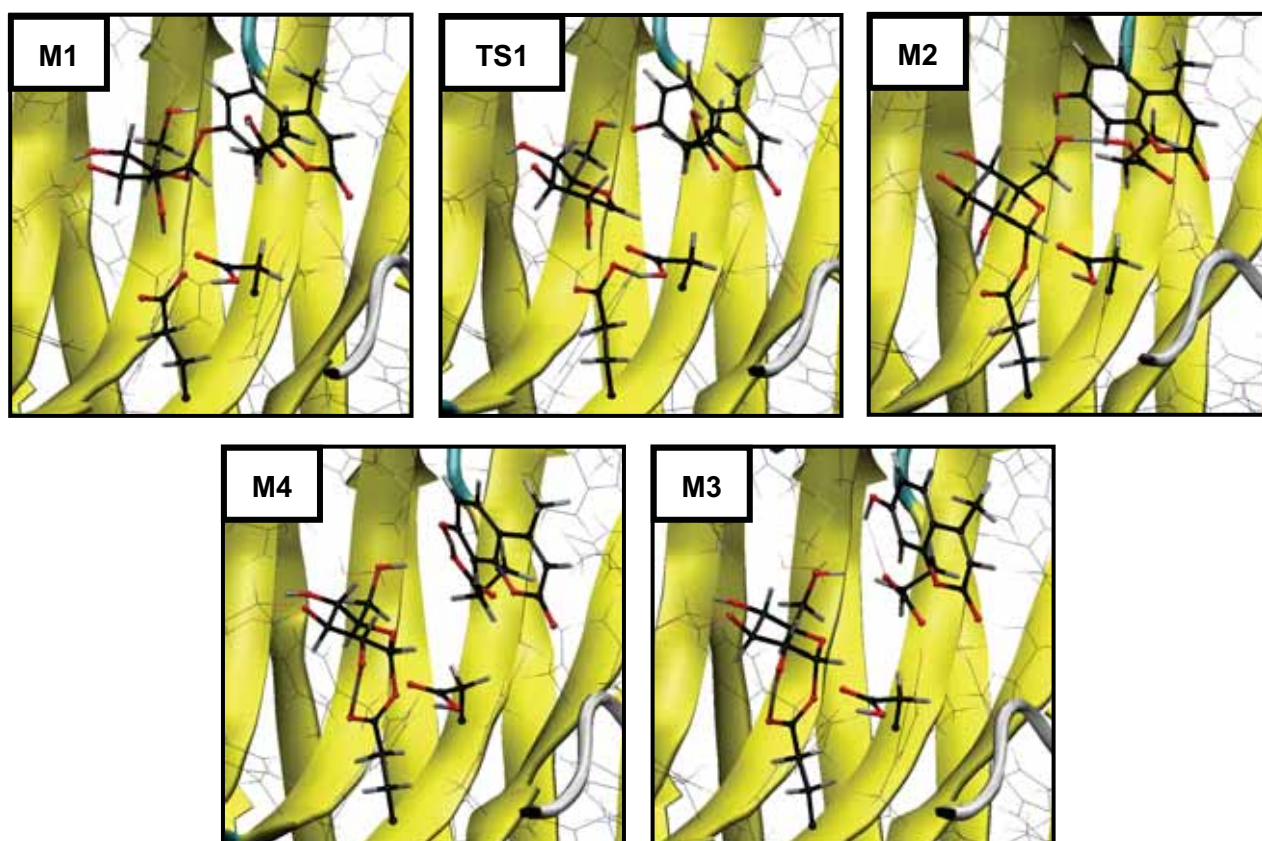


Figura VI.8. Estructures representatives dels punts característics de la superfície d'energia lliure del primer pas de la reacció enzimàtica

PRIMER PAS DE LA REACCIÓ ENZIMÀTICA

Segons els resultats de metadinàmica, la barrera energètica per al primer pas de reacció enzimàtica (TS1) és de $31.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, i el mínim d'energia corresponent a l'intermedi covalent de la reacció (M2) està situat $9.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ per sobre del pou de reactius (M1). Experimentalment, per a la lisosima s'ha predit una energia d'activació de $24 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ amb un substrat tipus metilumbeliferil-sacàrid²⁴ similar a l'emprat en aquest model de reacció de la 1,3-1,4- β -glucanasa. A nivell teòric, per a la lisosima (HEWL) *Bottoni i col.*⁸⁵ varen obtenir una barrera de $23.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ per al primer pas de reacció, i una energia de $14 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ per a l'intermedi covalent. Cal tenir present que es tracta d'enzims i/o de substrats diferents, i per tant els valors d'energia lliure no tenen perquè coincidir exactament, però es mantenen en el mateix ordre de magnitud.

VI.3.3. Anàlisi de l'Estat de Transició

Al llarg del camí de reacció enzimàtica té lloc una important separació de càrregues fruit del trencament heterolític de l'enllaç glicosídic. Aquesta separació de càrregues s'ha quantificat a través de les fluctuacions en les càrregues RESP¹³³ dels àtoms QM. Al capítol de fonaments s'ha descrit com es calculen aquestes càrregues en l'esquema d'interaccions electrostàtiques emprat en aquestes simulacions (secció II.2.1.1 a la pàgina 41). A la Figura VI.9 es mostra l'evolució de les càrregues RESP dels àtoms C1, O1 i O5 en funció de la conformació adoptada pel substrat al llarg de la trajectòria. La conformació adoptada pel substrat es representa en funció del valor del diedre representatiu 4H3 (angle ϕ): valors positius indiquen conformacions similars a *skew* 1S_3 (reactius), valors negatius conformacions similars a la cadira 4C_1 (productes) i un valor de ϕ al voltant de 0 es correspon a conformacions properes a un *half* 4H_3 (estat de transició). Així doncs, aquest diedre permet seguir l'evolució de la reacció a través d'una sola coordenada.

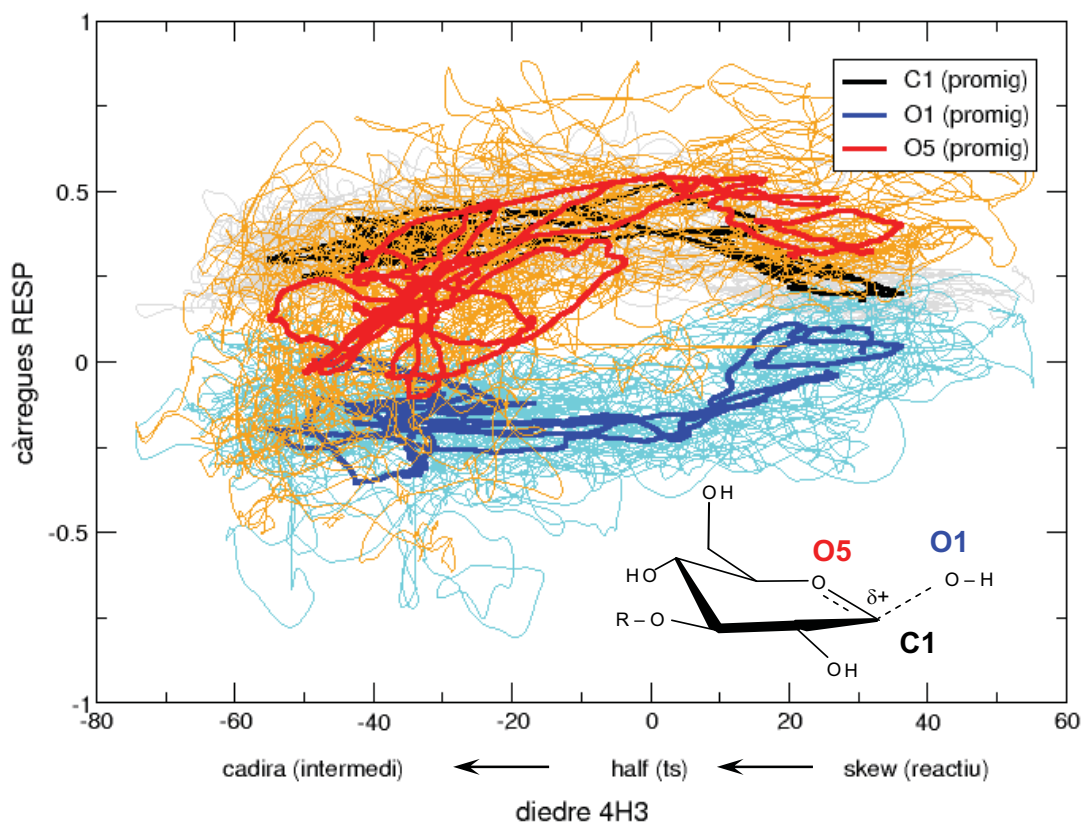


Figura VI.9. Evolució de la distribució de càrregues en el substrat al llarg del primer pas de la reacció enzimàtica.

En una línia més gruixuda i de color més intens es representa el promig cada 500 punts dels valors corresponents a la càrrega RESP de cada àtom al llarg de la trajectòria. S'observa clarament una correlació entre les càrregues dels àtoms C1 i O5 amb l'àtom O1. En el pas de reactius a l'estat de transició, la càrrega sobre el carboni anomèric (C1) augmenta conjuntament amb la càrrega de l'oxigen pirànic (O5), mentre que la càrrega de l'oxigen glicosídic (O1) disminueix. Això és una clara evidència que durant el primer pas de reacció enzimàtica té lloc una separació de càrregues entre el substrat i el grup sortint: el trencament heterolític de l'enllaç glicosídic comporta l'acumulació de càrrega negativa sobre l'oxigen glicosídic (O1) de l'aglicó, mentre que l'anell de substrat queda polaritzat positivament (àtoms C1 i O5).

La polarització de la densitat electrònica porta associats canvis en l'estructura interna del substrat. A la Figura VI.10 es mostra l'evolució de la distància de l'enllaç endocíclic entre el carboni anomèric i l'oxigen pirànic (distància C1–O5). Es pot observar com en el transcurs de la reacció aquesta distància disminueix quan la conformació del substrat és tipus *half*⁴H₃ (en l'estat de transició), i després torna a recuperar la distància inicial en formar-se l'intermedi covalent.

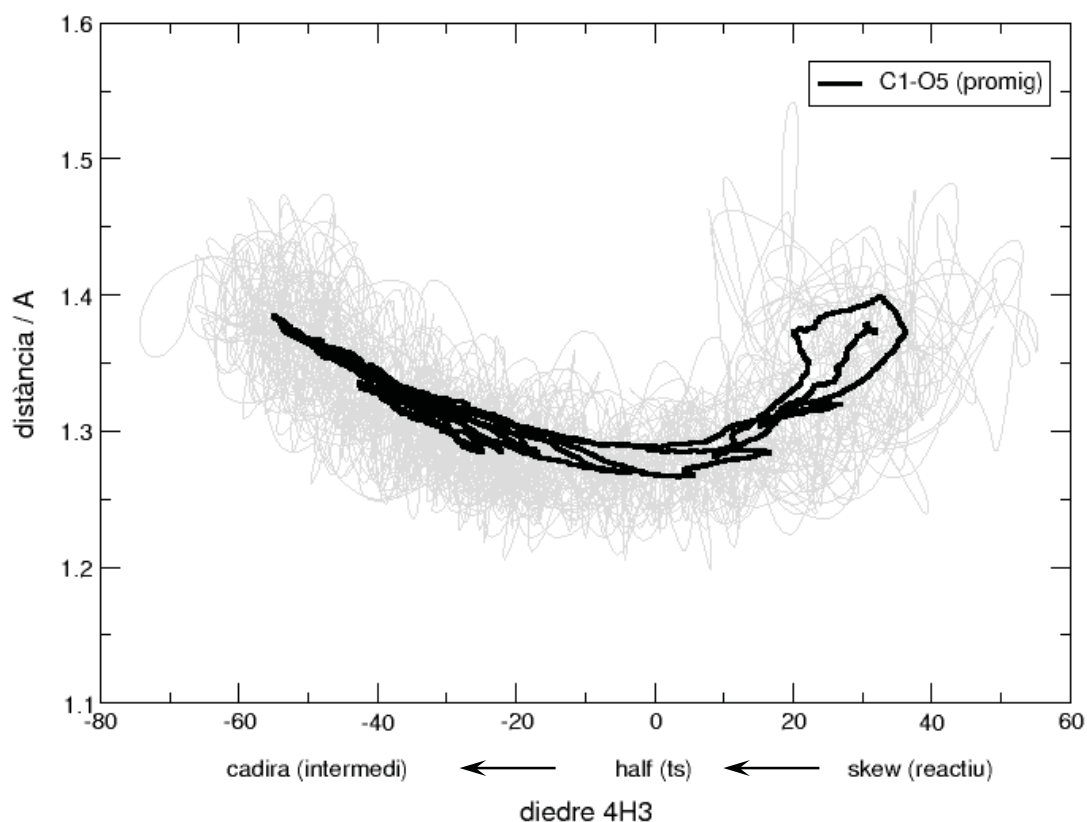
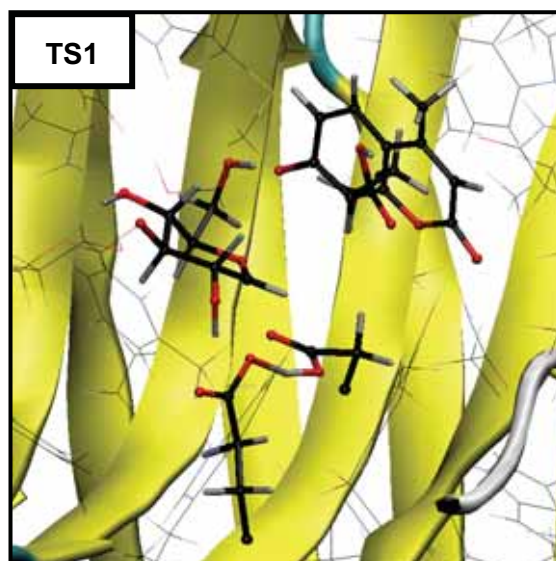


Figura VI.10. Evolució de l'enllaç endocíclic (C1–O5) del substrat al llarg del primer pas de la reacció enzimàtica.

La major disminució de la distància d'enllaç C1–O5 té lloc al voltant de la conformació *half* 4H_3 . Aquest escurçament coincideix amb el màxim desenvolupament de càrrega positiva sobre el mateix enllaç (Figura VI.9). Per tant, aquests resultats mostren que al llarg de la reacció enzimàtica té lloc una important separació de càrregues que es tradueix en la formació d'una estructura de tipus oxocarbocàtionic. El mapa d'energia lliure confirma que aquesta estructura és la corresponent a l'estat de transició de la reacció enzimàtica (TS1 a la Figura VI.7 i a la Figura VI.8).

En l'estructura de l'estat de transició, l'enllaç glicosídic està completament dissociat. És a dir, l'estat de transició de la reacció enzimàtica és de tipus dissociatiu, en el que el trencament de l'enllaç glicosídic s'avança respecte la transferència de protó i la formació de l'intermedi glicosil-enzim. Un comportament d'aquestes característiques és comú en les β -glicosidases en general⁵.



L'anàlisi de *Hammett* de substrats amb grup sortints de diferent acidesa permet analitzar la dependència de k_{cat} sobre l'acidesa de l'aglicó. A la Figura VI.11 es mostra aquesta anàlisi per al cas concret de la 1,3-1,4- β -glucanasa dut a terme per *Planas i col.* amb substrats d'aglicons aromàtics de diferent acidesa⁵⁴. Per tot el rang de pK_a analitzat, els autors van observar una clara dependència entre la reactivitat de l'enzim i el tipus de grup sortint.

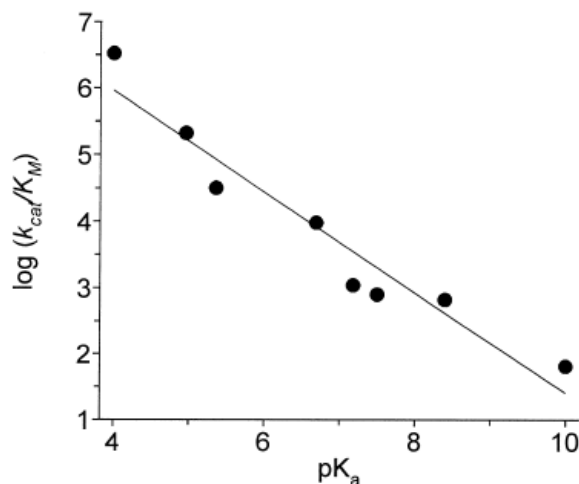


Figura VI.11. Diagrama de Hammett per la hidròlisi enzimàtica de diferents aril-glicòsids en 1,3-1,4- β -glucanasa.⁵⁴

Aquells substrats amb un aglicó de major acidesa són els més actius en termes de k_{cat}/K_M , mentre que aquells amb aglicons més bàsics presenten una menor reactivitat. L'increment de reactivitat amb aglicons més àcids és deguda a que aquests poden acomodar millor una càrrega negativa sobre l'oxigen de l'enllaç glicosídic que s'ha de trencar. Aquests resultats mostren, per una banda, que el pas limitant de la reacció enzimàtica és el primer pas de la reacció en el que l'aglicó es desenllaça del substrat. D'altra banda també mostren que té lloc una important separació de càrregues, acomodant-se càrrega negativa sobre l'oxigen glicosídic de l'aglicó. Els resultats de la simulació duta a terme en aquest capítol mostren que efectivament aquesta separació de càrregues té lloc al llarg de la reacció enzimàtica, i és màxima en l'estat de transició.

VI.4. Resum i Conclusions

En aquest capítol s'ha portat a terme una modelització del primer pas de reacció enzimàtica de la 1,3-1,4- β -glucanasa amb un substrat tipus metilumbeliferil-tetrasacàrid mitjançant simulacions QM/MM-CPMD acoblades a metadinàmica. Els resultats mostren que aquest enzim segueix un mecanisme de reacció a través de la formació d'un intermedi covalent glicosil-enzim. Aquest tipus de mecanisme està àmpliament estès i acceptat per a les β -glicosidases en general que actuen amb retenció de configuració sobre el carboni anomèric. Com a resultat d'aquesta simulació s'ha obtingut l'estructura de l'intermedi covalent de la 1,3-1,4- β -glucanasa, la qual no es disposava experimentalment, completant-se així la informació estructural de tot els estats de la reacció enzimàtica d'aquest enzim: el complex de *Michaelis* i l'intermedi covalent han estat predits computacionalment en aquesta tesi i el complex enzim-producte ha estat resolt cristal·logràficament per *Gaiser i col.*⁴⁹

Al mateix temps, la simulació també ha permès determinar l'estructura de l'estat de transició. Tal com s'ha descrit al capítol introductori (secció I.1.3.1 a la pàgina 7) a partir de mesures d'efecte cinètic isotòpic secundari de deuteri es pot induir que en l'estat de transició té lloc un canvi d'hibridació en el carboni anomèric⁸. Aquest canvi d'hibridació ha estat corroborat en l'anàlisi de la trajectòria de la simulació (veure Figura VI.5). A més, s'ha pogut determinar les propietats estructurals i electròniques (Figura VI.9 i Figura VI.10) de l'estat de transició. Conèixer amb detall l'estructura (geomètrica i electrònica) de l'estat de transició és de rellevant importància en el camp de l'enzimologia, en tant que dona peu al desenvolupament d'inhibidors. Aquells inhibidors que són el més similars possibles a l'estat de transició de qualsevol reacció enzimàtica s'uneixen a l'enzim amb major afinitat.

Les conclusions a les que s'ha arribat són les següents:

- l'itinerari conformacional del substrat al llarg del primer pas de la reacció enzimàtica de la 1,3-1,4- β -glucanasa és de tipus ${}^1S_3 \rightarrow {}^4H_3 \rightarrow {}^4C_1$.
- aquest itinerari conformacional pot ser predit a través del mapa d'energia lliure conformacional del substrat en la cavitat enzimàtica.
- el mecanisme de reacció enzimàtica involucra la formació d'un intermedi covalent glicosil-enzim, a través d'un estat de transició oxocarbocatiònic.
- l'aglicó de tipus metilumbeliferona és d'acidesa similar a la del residu àcid general (Glu109) de l'enzim.