

Desxifrant mecanismes enzimàtics per mitjà d'eines computacionals: implicacions biotecnològiques en l'estudi de glicosidases

Unraveling enzymatic mechanisms by means of computational tools: biotechnological implications in the study of glycosidases

Lluís Raich^{1,3} i Carme Rovira^{1,2,3}

¹ Universitat de Barcelona. Departament de Química Inorgànica i Orgànica. Secció de Química Orgànica

² Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA)

³ Institut de Química Teòrica i Computacional de la Universitat de Barcelona (IQTCUB)

Resum: El creixement de la glicòmica (camp anàleg al de la genòmica o la proteòmica però centrat en glicòsids) i el desenvolupament de tests de diagnòstic, vacunes i nous fàrmacs basats en carbohidrats es veuen afectats per la falta de mètodes eficients per a la seva producció. La síntesi enzimàtica, caracteritzada per la seva gran estereo- i regioselectivitat duta a terme en condicions suaus, representa una encoratjadora solució per resoldre aquest problema. En aquest aspecte, les glicosilhidrolases (GH) amb retenció de configuració tenen un gran potencial per ser redissenyades per sintetitzar carbohidrats per transglicosidació. La conversió de glicosidases (GH) a transglicosidases (TG), és a dir, d'enzims que hidrolitzen carbohidrats a enzims que els sintetitzen, ha estat molt estudiada en els darrers anys. Tot i així, la falta d'estructures d'enzims i el desconeixement dels detalls dels mecanismes de reacció limiten el disseny racional de TG. En aquest article exposem com la química teòrica i les simulacions de dinàmica molecular de primers principis poden aportar el coneixement fonamental per a la producció d'aquestes valuoses variants enzimàtiques.

Paraules clau: Catàlisi enzimàtica, carbohidrats, glicosidases, dinàmica molecular, química computacional, mètodes QM/MM.

Abstract: The growth of glycomics (a field analogous to genomics or proteomics but focused on glycosides) and the development of diagnostic tests, vaccines and new therapeutics based on carbohydrates are hampered by the lack of effective tools for their production. Enzymatic synthesis, characterized by its high stereo- and regioselective products obtained under mild conditions, is a promising approach to solve this problem. In this regard, retaining glycoside hydrolases (GHs) have a high potential to be engineered to synthesize carbohydrates by transglycosylation. The conversion of GHs into TGs, i. e. from enzymes that perform hydrolysis to enzymes that perform synthesis, has received great attention in the last few years. Nevertheless, the lack of enzyme structures and the limited knowledge of the molecular basis of transglycosylation is hindering rational design of TGs. In this work, we show how theoretical chemistry and first principles molecular dynamics simulations can provide fundamental insight for the production of such valuable enzymes.

Keywords: Enzymatic catalysis, carbohydrates, glycoside hydrolases, molecular dynamics, computational chemistry, QM/MM approach.

Carbohidrats: els grans desconeguts

L antiga concepció que els carbohidrats són simplement una font d'energia ja fa temps que va passar a la història. Avui dia és ben conegut que els carbohidrats desenvolupen un paper fonamental en una gran quantitat de processos moleculars dins la cèl·lula, des de la detecció d'agents patògens, com ara bacteris i virus, fins a la comu-

nicaació cel·lular o la resposta antiinflamatòria [1]. És per això que hi ha un gran interès en el disseny de fàrmacs que imiten l'estructura de carbohidrats, ja que aquests serien fàcilment assimilats i reconeguts per part del sistema biològic receptor.

Actualment disposem de fàrmacs amb estructura de carbohidrats per tractar malalties com la grip, la diabetis, la sida o el càncer (figura 1) [2]. No obstant això, la síntesi d'aquest tipus de molècules al laboratori és generalment àrdua, ja que requereix anys de treball i se n'obtenen baixos rendiments per mitjà de mètodes de síntesi química convencional [3].

La complexitat química dels carbohidrats no rau únicament en la reactivitat similar dels grups funcionals que els componen (normalment, hidroxils; no és trivial funcionalitzar-ne un

Correspondència: Carme Rovira

Institut de Química Teòrica i Computacional de la Universitat de Barcelona (IQTCUB)

C. de Martí i Franquès, 1. 08028 Barcelona

Tel.: +34 934 039 254. Fax: +34 933 397 878

A/e: c.rovira@ub.edu

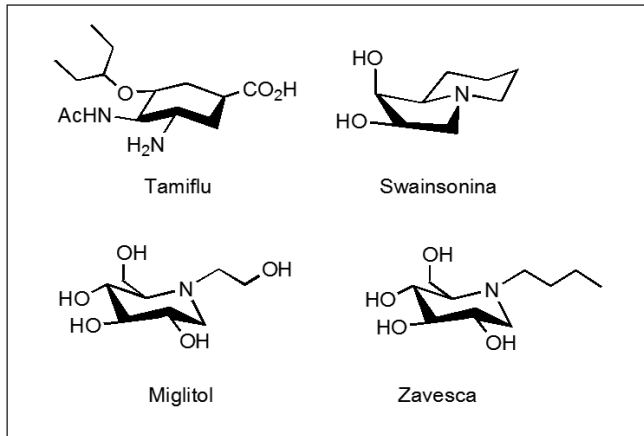


FIGURA 1. Exemples de derivats de sucres que s'utilitzen o estan sota investigació per al tractament de la grip (Tamiflu); càncers renal, colorectal i de pit (swainsonina); diabetis (miglitol); sida i malalties de Fabry i Gauche (Zavesca).

en concret), l'extens nombre de combinacions possibles per unir les unitats de sucre (enllaços 1-1, 1-2, 3-4, etc.) o la seva estereoisomeria (α o β). A més a més, els carbohidrats disposen d'un extens espai conformacional que recentment s'ha descobert que és molt important per al disseny d'inhibidors (figura 2) [4].

Per tant, obtenir al laboratori un derivat d'un carbohidrat concret amb unes característiques ben definides (e. g. penta-sacàrid d'enllaços alternats β -1,3-1,4 de glucosa amb el sucre de l'extrem en una conformació rígida 4S_3) pot ser una autèntica odissea. Aquest contratemps, clarament, obstaculitza el desenvolupament de tot un arsenal de fàrmacs potencials que podrien usar-se per tractar el gran nombre de malalties relacionades amb enzims actius en carbohidrats.

L'eina clau dels sistemes biològics

Com ho fan, doncs, els sistemes biològics per generar aquestes molècules tan complexes? Com sempre, la resposta es troba en l'observació minuciosa de la natura: al llarg d'anys i anys d'evolució, la natura ha dissenyat uns enzims especialitzats que s'anomenen *glicosiltransferases* (GT), capaços de sintetitzar carbohidrats de manera específica i eficient per mitjà de substrats activats (normalment, monosacàrids com ara la glucosa o la galactosa, units a un nucleòtid com ara l'UDP). El problema a l'hora d'emprar aquests enzims al laboratori és que són de difícil manipulació. A més, l'ús de substrats activats fa que el procés global resulti econòmicament inviable tant per a petits grups d'investigació com per a grans empre-

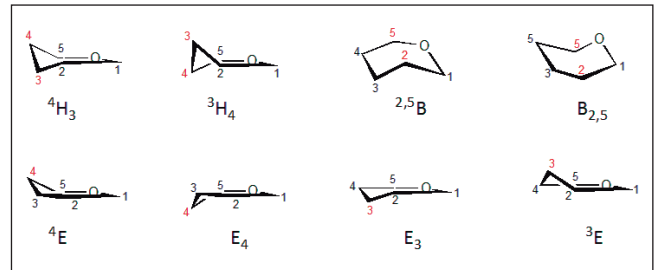


FIGURA 2. Conformacions d'un anell de piranosa i la seva notació, rellevants per a l'estudi de mecanismes de glicosidases.

ses farmacèutiques. La solució a aquestes complicacions, paradoxalment, pot venir d'uns enzims hidrolítics anomenats *glicosidases* (GH), molt més fàcils de manipular al laboratori i capaços d'usar substrats menys costosos. En particular, les glicosidases que presenten retenció de configuració respecte a l'enllaç que trenquen són les més prometedores i ja s'han desenvolupat estratègies de bioenginyeria per revertir-les a enzims que facin síntesi [5].

Les glicosidases hidrolitzen els enllaços glicosídics dels sucres en dues etapes (figura 3) per mitjà de dos residus catalítics: un nucleòfil (normalment, glutamat o aspartat) i un assistent àcid/base (glutàmic o aspàrtic). La cavitat enzimàtica, dividida en llocs d'unió (o *subsites*) positius i negatius (on es col·loquen les unitats de sucre del carbohidrat; vegeu la figura 4), afavoreix la reacció i determina la connectivitat i l'estereoisomeria del substrat, la qual cosa fa que el procés sigui ràpid i selectiu.

Els camins hidrolítics i els sintètics no es defineixen fins a arribar a un intermedi de reacció clau (GEI) en el qual l'enzim queda glicosilat (el residu nucleòfil forma un enllaç covalent amb el sucre als *subsites* negatius), una bifurcació en la qual molècules d'aigua (que defineixen el camí hidrolític) i altres carbohidrats (que defineixen el camí sintètic) competeixen en una cursa per veure qui s'enllaça primer als *subsites* positius i reacciona (figura 4).

Es tracta, en efecte, d'una competició cinètica on el producte hidrolític té un doble avantatge: a) la reacció es duu a terme en medi aquós (55 M d'aigua enfront de 10^{-4} M de substrat que s'usa normalment) i b) és el producte termodinàmicament favorable (ca. 3 kcal/mol per a la cel·lobiosa) [6]. Per tal d'afavorir la síntesi o transglicosidació, doncs, cal que la constant de velocitat d'aquest camí compensi els avantatges del camí hidrolític, sigui millorant les interaccions de l'estat de transició sintètic, sigui posant obstacles al camí hidrolític. Es neces-

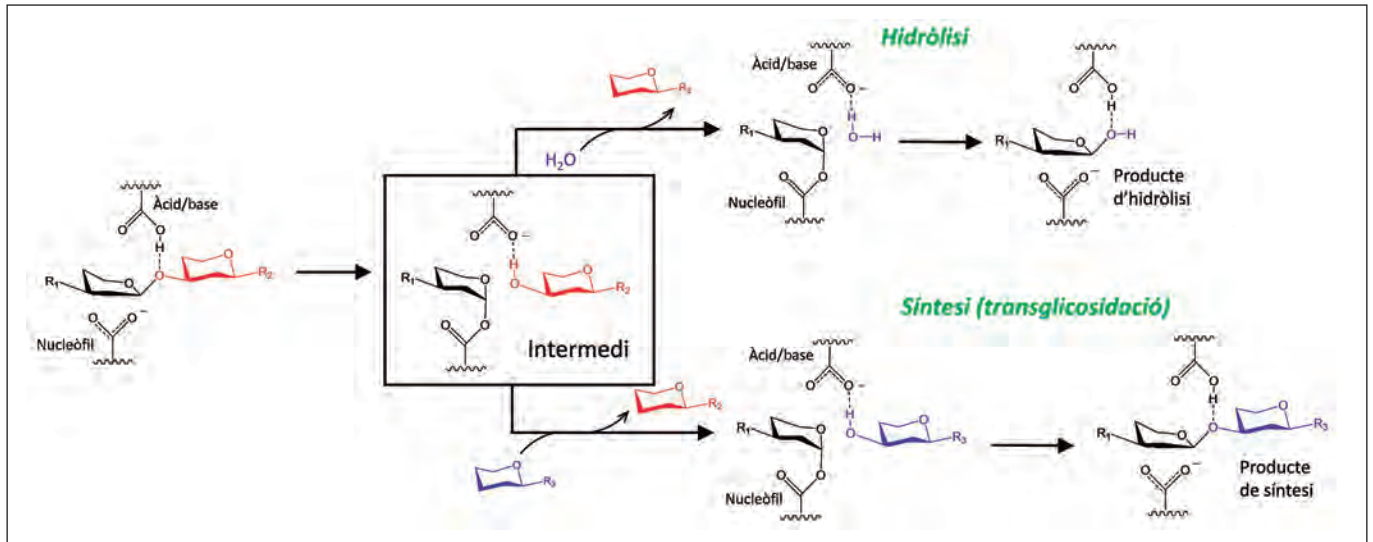


FIGURA 3. Mecanismes de reacció de les glicosidasas.

sita, per tant, comprendre a escala molecular com funciona la maquinària d'aquests enzims, desentranar els seus secrets, per poder realitzar petites modificacions en la seva estructura i, així, revertir la seva funció original.

Transglicosidasas: una excepció a la hidròlisi

Aquesta idea d'anar contra corrent no és quelcom que no hagi provat ja la natura. Si bé a l'interior de la cèl·lula les molècules energètiques (ATP, UDP...) són abundants, a l'exterior la concentració és molt menor. Aquesta observació va portar a la qüestió de com certs organismes, com ara els fongs, podien mantenir l'homeòstasi de les seves parets glicosídiques sense fer ús de glicosiltransferases [7]. La resposta són uns enzims que estan classificats com a glicosidasas (d'acord amb la seva

estructura terciària), però que presenten una activitat sintètica inusual: les transglicosidasas (TG).

Experiments en TG naturals i en variants generades per mitjà d'enginyeria d'enzims demostren com aquests enzims tenen una eficiència catalítica menor (*i. e.* energies d'activació o barreres de reacció més grans) que els seus anàlegs hidrolítics [7, 9], la qual cosa dona lloc a productes cinètics estables abans no s'assoleix l'equilibri termodinàmic. És conegut que factors com l'enllaç del substrat acceptor als llocs positius (figura 4), la migració d'aigua dins el centre actiu o les interaccions a l'estat de transició (TS) influeixen en les barreres de reacció; per tant, modificacions en l'enzim que afectin aquests factors poden afectar la relació entre els productes d'hidròlisi i de síntesi. Tot i així, no hi ha una manera directa, fàcil i racional de generar aquestes variants enzimàtiques. El nombre limitat d'estructures de raigs X amb substrats acceptors enllaçats i la falta d'informació molecular durant la reacció de síntesi (particularment, interaccions carbohidrat-enzim que tenen lloc a l'estat de transició) són part de la causa.

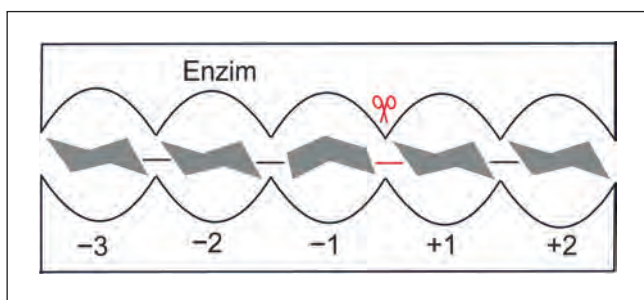


FIGURA 4. Llocs d'unió (*subsites*) de les unitats de sucre del carbohidrat en una glicosidasas. L'enllaç glicosídic que l'enzim trenca, sempre situat entre els llocs -1 i +1, està indicat amb una línia vermella. Reproduït amb el permís de [8]. Copyright 2015 American Chemical Society.

Microscopi computacional: desxifrant el mecanisme de reacció d'una transglicosidasas

Recentment, amb col·laboradors experimentals d'àmbit nacional i internacional, hem desxifrat el mecanisme sintètic d'una transglicosidasas anomenada Gas2, de l'organisme *Saccha-*

Saccharomyces cerevisiae (ScGas2) [10]. Es tracta d'un enzim que es troba ancorat a la paret cel·lular del fong *Saccharomyces cerevisiae* per mitjà d'un glicolipid (glicosilfosfatidilinositol) i que té per funció mantenir i remodelar l'1,3- β -glucà que la forma [11]. La seva versatilitat fa que sigui capaç tant d'hidrolitzar carbohidrats com de formar-ne, depenent de l'entorn (figura 5a) [12].

El punt de partida del nostre estudi computacional és una estructura cristal·logràfica única per les seves característiques: un intermedi de reacció entre ScGas2 i un tetrasacàrid d'1,3- β -glucosa (G4-ScGas2), juntament amb un pentasacàrid com a substrat acceptor (G5; figura 5b). El simple fet d'atrapar un intermedi de reacció en un enzim ja és important, perquè és una prova experimental irrefutable del mecanisme de dues etapes (figura 3). Encara més rellevant és capturar un substrat acceptor enllaçat al centre actiu, ja que normalment

aquests difonen cap al si de la dissolució en una escala de temps més petita que la de la mesura. Aquesta estructura excepcional, caracteritzada pels nostres col·laboradors experimentals fent ús d'un substrat activat (1-fluoro-1-desoxi- β -glucòsid, G2F) i una variant inactiva de l'enzim (mutació de l'àcid/base), conjuntament amb tècniques d'immersió o *soaking* (el cristall obtingut se submergeix en una dissolució del substrat acceptor), és la primera estructura d'una TG complexada amb glicòsids naturals. En l'àmbit teòric, representa l'escenari ideal, ja que no cal realitzar cap aproximació de modelització per construir el complex ternari (e. g. per mitjà de tècniques d'encaix molecular o *docking*).

Un dels problemes computacionals que sorgeixen en estudiar reaccions enzimàtiques és que cal descriure la densitat electrònica del sistema per mitjà de mètodes de mecànica quàntica i, alhora, tractar un nombre d'àtoms molt elevat (per a un

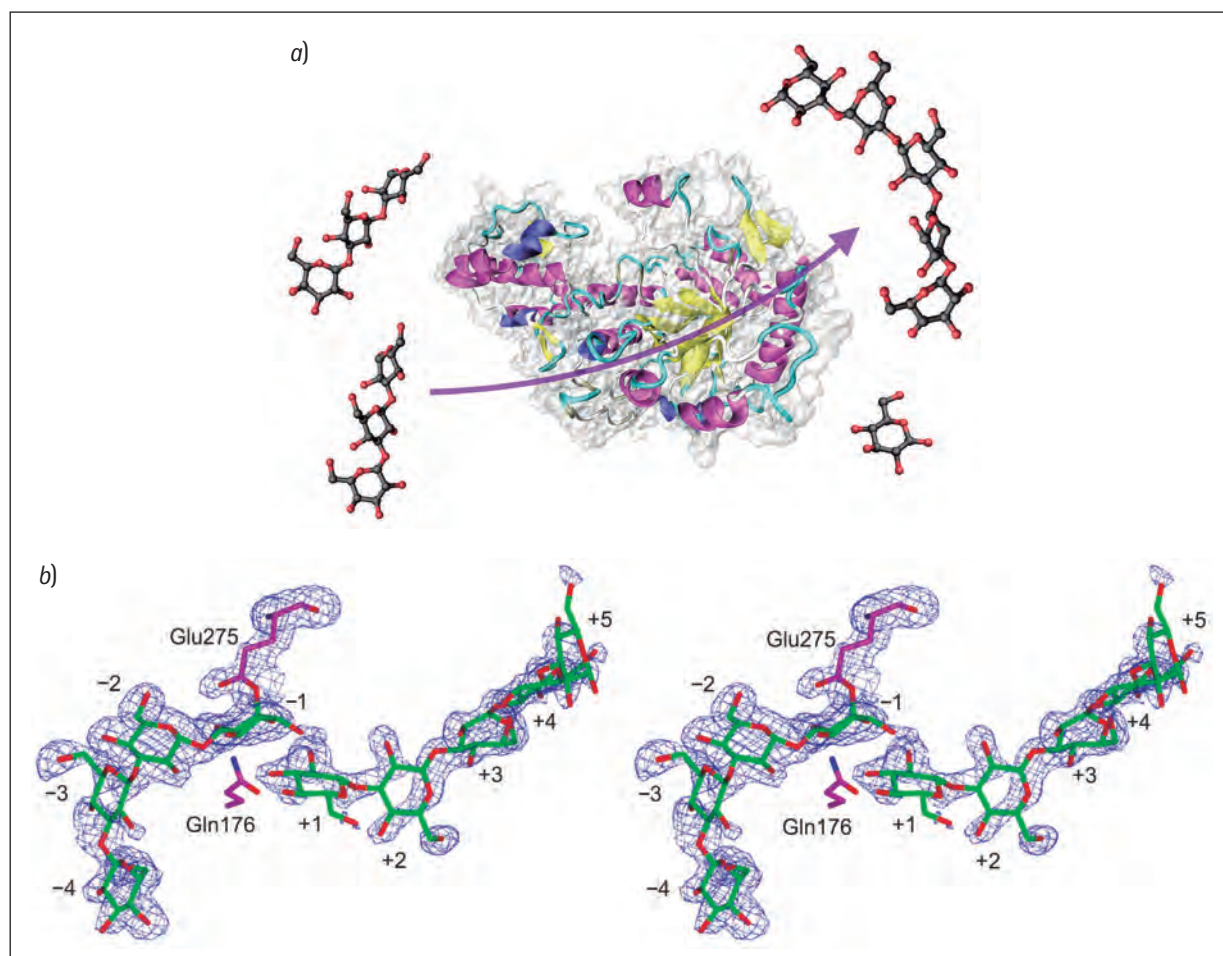


FIGURA 5. a) Transglicosidasa Gas2 de *Saccharomyces cerevisiae* (ScGas2), focus d'aquest treball. b) Mapa de densitat electrònica i estructura de l'intermedi de reacció del mutant Glu176Gln de ScGas2 complexat amb un acceptor pentasacàrid obtingut per difracció de raigs X. Per a més claredat, només es mostren les unitats de sucre i els residus catalítics, Glu175 (nuclèofil) i Glu176 (àcid/base). Reproduït amb el permís de [10]. Copyright 2016 American Chemical Society.

dels enzims més petits, el lisozim de clara d'ou, ≈ 2.000 àtoms, sense tenir en compte les molècules d'aigua del solvent). Avui dia, sistemes quàntics d'aquesta mida són impracticables amb els superordinadors de què disposem.

Aquesta limitació pot superar-se fent ús d'un mètode híbrid o multiescala que tracta el sistema en dos àmbits teòrics diferents (figura 6): d'una banda, mecànica molecular (descripció per mitjà de camps de forces) i, de l'altra, mecànica quàntica (descripció per mitjà de la densitat electrònica). Aquest mètode, conegut per les sigles QM/MM (*quantum mechanics / molecular mechanics*) [13], fa viable l'estudi de reaccions químiques per a sistemes amb un nombre elevat de graus de llibertat. Els seus desenvolupadors, A. Warshel, M. Levitt i M. Karplus, varen rebre el Premi Nobel de Química el 2013 [14].

Flexibilitat enzimàtica

Atès que l'estructura cristal·logràfica representa una mitjana temporal del conjunt de les estructures compatibles amb la temperatura de cristallització (*ca.* 100 K) i l'enzim és actiu a temperatures vora dels 300 K, cal realitzar un «equilibratge» o ajust de l'estructura a la temperatura de treball que sigui suficientment llarg per capturar tots els possibles canvis conformacionals de l'enzim (o, almenys, els més importants). Aquesta etapa d'equilibratge esdevé especialment necessària en el nostre cas, ja que l'estructura resolta per raigs X correspon a una variant inactiva de l'enzim ScGas2 (mutació d'un residu essencial per a la catàlisi, el residu àcid/base, per evitar que l'intermedi evolucioni cap als productes de la reacció), i en revertir la mutació per modelar l'enzim natural, cal que les interaccions pròximes a la modificació s'equilibrin fins a optimitzar-se.

En aquestes simulacions inicials d'exploració conformacional, en tant que no es trenquen ni es formen enllaços químics, pot fer-se ús de mètodes que descriuen el sistema per mitjà de camps de forces. D'aquesta manera, gràcies al baix cost computacional que requereix cada integració temporal en comparació amb sistemes tractats *ab initio*, podem assolir escales de temps que arriben als microsegons.

En el cas de l'enzim ScGas2, l'estructura assoleix l'equilibri, d'acord amb l'arrel quadrada de la desviació quadràtica mitjana (RMSD) dels àtoms que formen la cadena principal de l'en-

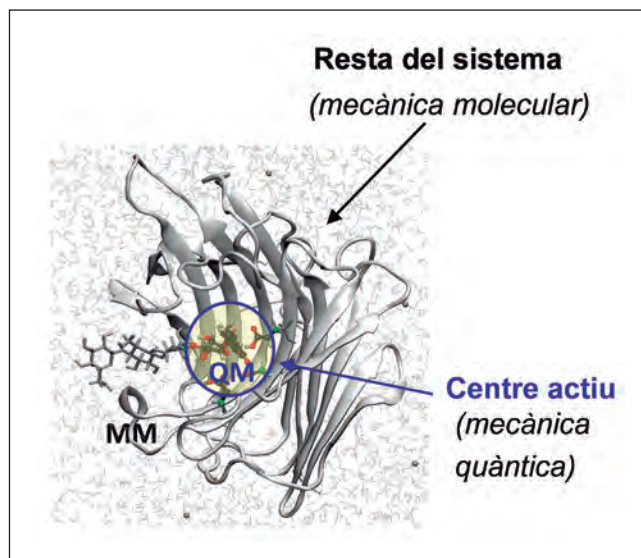


FIGURA 6. Divisió del sistema (proteïna, carbohidrat i solvent) en dues regions, segons el mètode QM/MM.

zim, durant els primers 18 nanosegons. Al cap d'aquest període de temps, la simulació posa de manifest la formació d'interaccions de potencial rellevància per al mecanisme de reacció. Per exemple, un residu d'asparagina (Asn175) forma un pont d'hidrogen amb l'hidroxil 2 (2-OH, en endavant) de la unitat de sucre que està enllaçada a l'enzim (el sucre situat al lloc -1, d'ara endavant, sucre -1; figura 4). Aquesta interacció no es podia haver observat a l'estructura cristal·logràfica a causa de la modificació d'un dels residus essencials proper al 175 (mutació Glu176Gln; figura 5). Un altre detall important de la simulació és que, a diferència d'altres substituents del sucre -1, el 2-OH explora dos estats (o adopta dues configuracions clarament diferenciades; figura 7): un en el qual interacciona per pont d'hidrogen amb el nucleòfil (en endavant, *configuració on*) i un altre en el qual fa una rotació de 180° per interaccionar amb molècules d'aigua del solvent (*configuració off*).

Mitjançant experiments cinètics, s'ha predit que les interaccions dels grups hidroxil (OH) del substrat en la posició -1 poden arribar a contribuir fins a 11 kcal/mol a la barrera de la primera etapa de la reacció (figura 3) [15]. Per tant, el fet que en la simulació teòrica s'observin dues conformacions del 2-OH pot tenir implicacions catalítiques importants. Això posa de manifest la necessitat de tenir en compte la flexibilitat de l'enzim a l'hora de preparar el sistema per al càlcul QM/MM [8, 16]. L'anàlisi de la dinàmica del substrat i l'enzim ens pot donar informació crucial de cara a l'estudi de mecanismes de reacció.

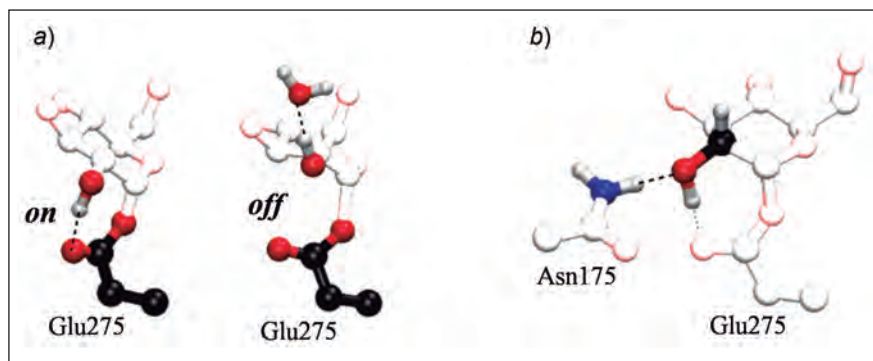


FIGURA 7. a) Configuracions *on* i *off* del grup 2-OH del sucre en el lloc -1 observades en la simulació de dinàmica molecular. b) Interacció de l'Asn175 amb el grup 2-OH. Reproduït amb el permís de [10]. Copyright 2016 American Chemical Society.

Mecanisme molecular de la reacció enzimàtica

En general, les reaccions enzimàtiques tenen energies d'activació prou elevades (15-25 kcal/mol; corresponents a temps mitjans de mil·lisegons a segons) perquè els processos que estudiem no es produeixen en l'escala de temps que es pot assolir amb mètodes QM/MM dinàmics (centenars de picosegons usant la teoria del funcional de la densitat). És per això que es requereixen tècniques que permetin incrementar les capacitats exploratòries de les simulacions.

En aquest estudi hem fet ús d'una tècnica anomenada *metadinàmica* [17], que consisteix a afegir potencials repulsius (normalment, funcions gaussianes) a configuracions explorades dins d'un espai definit per coordenades característiques de la reacció (o variables col·lectives) que cal definir *a priori*. Cada potencial repulsiu dipositat fa que l'energia en aquell punt s'incrementi d'acord amb l'alçada de la gaussiana i la probabilitat d'explorar de nou aquella regió, d'acord amb una estadística de Maxwell-Boltzmann, disminueix de manera exponencial. Com a resultat, el sistema explora zones del camí de reacció, incloent-hi reactius, productes, possibles intermedis i estats de transició, alhora que s'obté una estimació de l'energia lliure del procés reactiu.

Per descriure el procés de catàlisi enzimàtica de ScGas2, hem escollit tres variables col·lectives: una que preveu el trencament de l'enllaç substrat-enzim (CV_1), una altra per a la formació del nou enllaç glicosídic (CV_2) i una tercera que considera l'assistència de l'àcid/base desprotonant l'hidroxil de l'acceptor (CV_3 ; figura 8). El càlcul dona lloc a una superfície

tridimensional (l'energia lliure en funció de les tres variables col·lectives) que es pot representar per mitjà d'una isosuperfície, tot i que presentem els resultats en una projecció bidimensional per tal de facilitar-ne l'anàlisi.

La superfície d'energia lliure de la reacció de transglicosidació, considerant el grup 2-OH en configuració *on* (figura 9a), clarament indica que el mecanisme de síntesi en ScGas2 és concertat (és a dir, sense cap intermedi de reacció), amb dos mínims (GEI i MC) i un estat de transició (TS). La reacció comença amb l'elongació de l'enllaç entre el sucre enllaçat a l'enzim (el sucre -1) i el residu nucleòfil (Glu275), al mateix temps que l'hidroxil del sucre acceptor en la posició 3' (3'-OH) es va apropant al carboni anomèric (figura 9b). A l'estat de transició, que es troba 12 kcal/mol per sobre del GEI, l'anell de glucosa del *subsíte* -1 canvia la seva conformació de «càdira» a «sobre» (de 4C_1 a 4E), una conformació que afavoreix la deslocalització dels parells solitaris de l'oxigen pirànic (O5) a fi d'estabilitzar la càrrega positiva que es desenvolupa en el

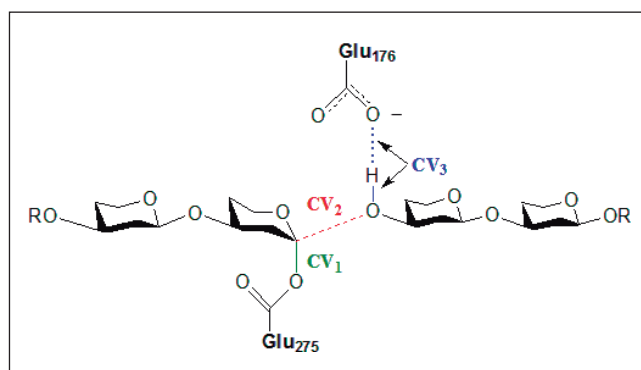


FIGURA 8. Variables col·lectives (CV_1 , CV_2 i CV_3) emprades en la simulació de la reacció de transglicosidació usant la tècnica de metadinàmica. Reproduït amb el permís de [10]. Copyright 2016 American Chemical Society.

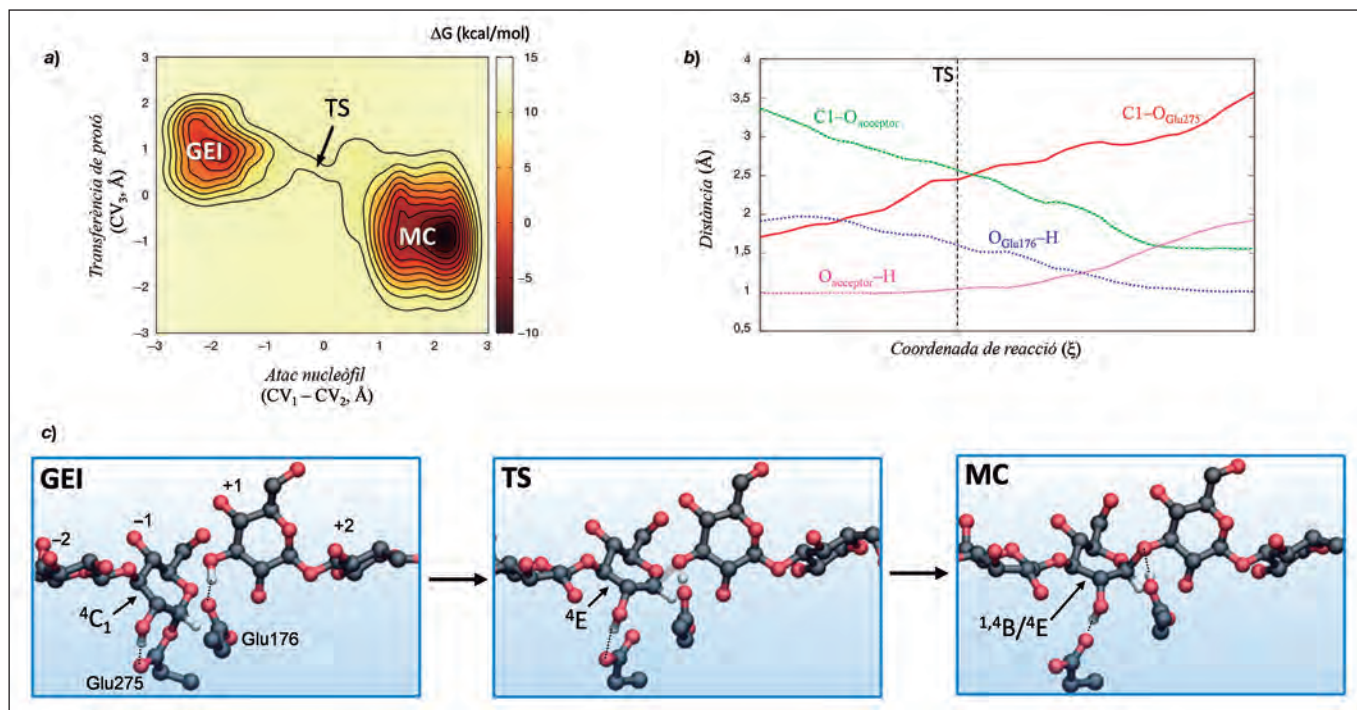


FIGURA 9. a) Superfície d'energia lliure de la reacció de transglicosidació (projecció en dues variables col·lectives) per a la configuració *on*. Línies de contorn a 2 kcal/mol. b) Evolució de les distàncies més rellevants al llarg de la coordenada de reacció: enllaç enzim-sucre (vermell), enllaç glicosídic acceptor-donador (verd), O_{acceptor}-H (rosa) i O_{Glu176}-H (blau). c) Mecanisme de la reacció de transglicosidació obtingut a partir de simulacions de metadinàmica QM/MM. Reproduït amb el permís de [10]. Copyright 2016 American Chemical Society.

carboni anomèric (figura 9c). En aquest punt, el nou enllaç glicosídic es troba parcialment format i el protó de l'hidroxil del sucre acceptor comença a transferir-se al residu àcid/base (Glu176) (la distància O3'-H comença a allargar-se) conservant les mateixes interaccions substrat-enzim presents al GEI. Una d'elles, en particular, el pont d'hidrogen Asn175...2-OH que hem descobert per mitjà de la simulació de dinàmica molecular inicial, és molt interessant en tant que experiments de mutagènesi dirigida mostren que un canvi del residu 175 a alanina (Asn175Ala) inactiva l'enzim. Això suggereix que la interacció Asn175...2-OH afecta significativament l'estat de transició de la reacció de transglicosidació.

Un cop superat l'estat de transició, 21 kcal/mol per sota en energia, es troba el mínim corresponent al producte de síntesi (MC), en què el nou enllaç glicosídic està completament format i el residu àcid/base de l'enzim està protonat. Aquí, el sucre -1 adopta una conformació intermèdia entre una «barca» i un «sobre» (^{1,4}B/⁴E). Aquesta conformació estaria altament preactivada per a la reacció de glicosilació (noteu que la reacció inversa a la que hem estudiat, en la qual l'enllaç glicosídic es trenca en comptes de formar-se, també és una reacció de glicosilació), d'acord amb el que s'ha descrit en la literatura

per a GH en general [18], ja que situa l'enllaç glicosídic (C1-O3') en posició axial.

És important notar que, en anar del GEI a l'MC, el 2-OH acaba interactuant amb el mateix àtom d'oxigen del residu nucleòfil que inicialment estava enllaçat al sucre (figura 9c). Per tant, cal esperar que aquesta interacció afecti la reacció enzimàtica.

Com influeix la interacció 2-OH...nucleòfil en el mecanisme i en les barreres de reacció? Com s'ha esmentat abans, els estudis cinètics han predit que aquesta interacció és fonamental perquè la reacció de glicosilació tingui lloc, encara que la seva contribució no s'ha pogut quantificar amb precisió. Per tal de fer-ho, hem simulat la mateixa reacció de la figura 9, però començant a partir de l'estat en què aquesta interacció no està formada, que hem anomenat *configuració off* (figura 7). Els càlculs mostren que, en aquest cas, el mecanisme continua sent concertat, tot i que l'evolució de les distàncies al llarg de la reacció posa de manifest que el mecanisme és més dissociatiu i asincrònic que en el cas anterior (figura 10b; la regió del TS es troba després de l'encreuament entre les distàncies C₁-O_{Glu275} i C₁-O_{acceptor}). Tanmateix, la reacció és molt més desfavorable des del punt de vista energètic, comparada amb la

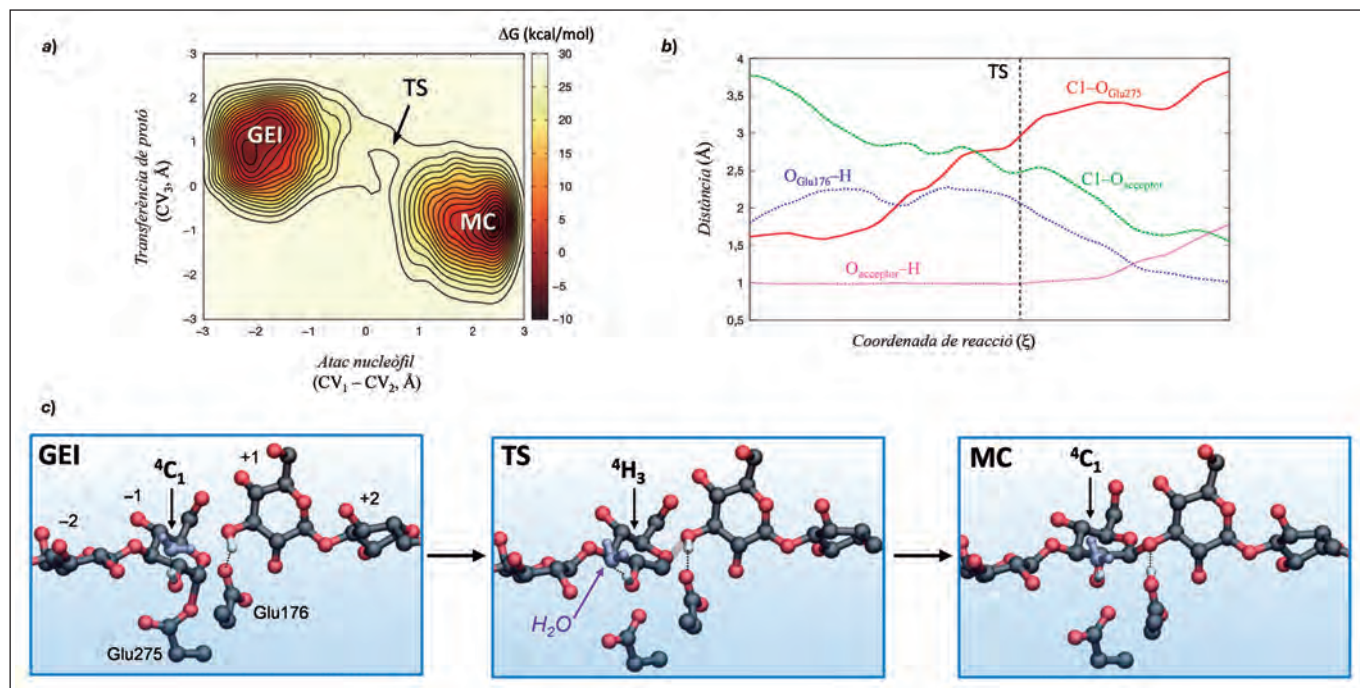


FIGURA 10. a) Superfície d'energia lliure de la reacció de transglicosidació (projecció en dues variables col·lectives) per a la configuració *off*. Línies de contorn a 2 kcal/mol. b) Evolució de les distàncies més rellevants al llarg de la coordenada de reacció: enllaç enzim-sucre (vermell), enllaç glicosídic acceptor-donador (verd), $O_{\text{acceptor}}-H$ (rosa) i $O_{\text{Glu176}}-H$ (blau). c) Mecanisme de la reacció de transglicosidació obtingut a partir de simulacions de metadinàmica QM/MM. Reproduït amb el permís de [10]. Copyright 2016 American Chemical Society.

del cas anterior (quan la interacció $2-OH \cdots$ nucleòfil estava formada, o configuració *on*), ja que presenta una barrera de reacció 16 kcal/mol més alta (figura 10a i taula 1).

Una altra diferència rellevant entre ambdós casos (amb i sense interacció $2-OH \cdots$ nucleòfil) rau en l'itinerari conformacional que segueix el sucre -1. En el primer cas (configuració *on*), hem vist que segueix un itinerari radial del tipus «cadira» \rightarrow «sobre» \rightarrow «barca»/«sobre» (${}^4C_1 \rightarrow [{}^4E]^{\ddagger} \rightarrow {}^1,4B/{}^4E$). En canvi, l'itinerari per a la configuració *off* és inusualment cíclic (capi-cua): comença amb una conformació «cadira» al GEI, passa per una mitja «cadira» a l'estat de transició i acaba de nou en «cadira» (${}^4C_1 \rightarrow [{}^4H_3]^{\ddagger} \rightarrow {}^4C_1$). Aquesta darrera conformació presenta l'enllaç glicosídic en posició equatorial i el fa menys reactiu de cara a l'atac per part del residu nucleòfil (Glu275) en la reacció de glicosilació (primera etapa de la reacció a la

figura 3). Per tant, la interacció $2-OH \cdots$ nucleòfil és essencial per a la catàlisi de ScGas2, ja que la seva absència augmenta la barrera de la reacció (en els dos sentits, glicosilació i transglicosidació, per 16 i 11 kcal/mol, respectivament) i influeix en les conformacions del substrat durant la reacció. Tenint en compte l'alta conservació d'aquesta interacció, aquests resultats són extensibles a moltes altres glicosidases.

Implicacions biotecnològiques

La simulació del mecanisme molecular de la reacció de síntesi (transglicosidació) de ScGas2 ens ha permès detectar interaccions que desenvolupen un paper fonamental en la reacció. El pont d'hidrogen $2-OH \cdots$ nucleòfil (figura 10c) és una interacció que contribueix, tal com hem comprovat, 16 kcal/mol a la barrera de la reacció de síntesi. Cal esperar, doncs, que qualsevol altra interacció o residu que d'alguna manera pertorbi aquest pont d'hidrogen tindrà un impacte catalític notori. Aquest és el cas del residu Asn175, que també pot formar un pont d'hidrogen amb el grup $2-OH$ (Asn175 \cdots $2-OH$, figura 7), de manera que competirà amb el nucleòfil. Resulta interessant que la interacció Asn175 \cdots $2-OH$

TAULA 1. Valors calculats (en kcal/mol) per a les energies lliures de reacció de les configuracions *on* i *off*

	ΔG^{*on}	ΔG^{*off}	$\Delta \Delta G^{*on-off}$
Transglicosidació	12	28	16
Glicosidació	21	32	11

es dona tant en el GEI com en el TS, però no a l'MC. Això fa pensar que probablement no afectarà igualment les barres de síntesi (transglicosidació) i de trencament de l'enllaç glicosídic (glicosilació).

Per tal de quantificar la contribució de la interacció Asn175...2-OH a les barreres de reacció, hem dissenyat una sèrie de càlculs en els quals reemplacem el residu Asn175 per alanina (s'han situat dues molècules d'aigua a la cavitat resultant de la substitució d'un residu gran per un de petit). Els resultats demostren que, efectivament, mentre que la barrera de deglicosilació es veu pràcticament inalterada, la barrera de glicosilació augmenta en 6,5 kcal/mol (taula 1). D'una banda, això explica el fet que la variant Asn175Ala de l'enzim sigui catalíticament inactiva, com han demostrat els experiments cinètics [12]. De l'altra, tal com veurem més endavant, els resultats obren la porta a utilitzar aquests tipus de variants per millorar els rendiments en la síntesi de sucres.

El clar desavantatge catalític de la variant Asn175Ala, no obstant això, pot suposar un gran avantatge biotecnològic. En aquest punt, cal recordar com s'ha pogut «capturar» experimentalment l'intermedi de la reacció de ScGas2 [10] (figura 5). L'ús d'una variant enzimàtica en la qual un dels residus catalítics ha estat abolit (l'àcid/base, Glu176) fa que l'enzim sigui inactiu en tant que totes les barreres de reacció (taula 1) augmenten molt per la falta d'assistència del grup àcid en els processos de trencament/formació de l'enllaç glicosídic. Emperò, s'ha pogut superar la primera barrera (glicosidació, figura 3) per mitjà de l'ús d'un substrat amb un bon grup sortint (G2F) o substrat activat, i així s'ha atrapat l'intermedi en tant que aquest no pot evolucionar cap a productes. Per tant, l'ús d'un substrat activat, junt amb la mutació del residu àcid/base, fa que la primera etapa (glicosilació) sigui prou ràpida i la segona sigui prou lenta per tal que s'acumuli l'intermedi de reacció. Aquesta ha estat l'estratègia seguida pels nostres col·laboradors experimentals per poder caracteritzar posteriorment l'intermedi mitjançant la cristallografia de raigs X.

De cara a assolir la síntesi (transglicosidació, figura 3), en canvi, ens interessa el contrari. Ens interessa que l'etapa de transglicosilació sigui ràpida per tal d'obtenir el producte, però que l'etapa de glicosilació sigui lenta per tal d'evitar que el producte entri de nou al cicle catalític (com a nou substrat) i s'acabi hidrolitzant.

D'acord amb les prediccions computacionals, la variant enzimàtica Asn175Ala, que elimina la interacció Asn175...2-OH, afecta en 6,5 kcal/mol la barrera de glicosilació, però deixa inalterada la de transglicosilació. Per tant, l'ús d'aquesta variant, juntament amb substrats activats, permetria assolir un intermedi de reacció que, interceptat per un substrat acceptor, donaria el producte de síntesi desitjat. La hidròlisi secundària no podria tenir lloc a causa de l'augment de la barrera de glicosilació i pel fet que el producte de síntesi no és un substrat activat.

Aquesta nova estratègia es pot aplicar a qualsevol glicosidasa que presenti un residu amb un rol equivalent al que adopta el residu Asn175 en ScGas2 (és a dir, que formi un pont d'hidrogen amb el 2-OH). De fet, recentment s'ha trobat que, en un enzim de la família GH1, la mutació Asn163Ala, on Asn163 fa el mateix paper que Asn175 en ScGas2, augmenta el rendiment de síntesi d'un 30 % en l'enzim natural a un 80 % en la variant. Molts altres enzims de diferents famílies presenten residus equivalents a Asn175 en ScGas2. Per exemple, Asn126 en la β -1,4-glicosidasa (Cex, família 10), His108 en la liquefacció de *Clostridium thermocellum* (CtLic26, família 26), Asn163 en la β -glucosidasa de *Thermus thermophilus* Hb8 (Tt β -gly, família 1), Asn175 en la celobiohidrolasa de *Trichoderma reesei* (Cel7A, família 7) o Asn127 en l'endo-1,4- β -xilanasasa d'*Streptomyces olivaceoviridis* E-86 (família 10). Per tant, efectuar mutacions en aquest residu és una prometedora estratègia per convertir, racionalment, una GH en una TG, és a dir, per convertir un enzim que trenca enllaços glicosídics en un que en forma de nous.

Conclusions

«What I can not create, I do not understand». Aquesta frase, atribuïda al premi Nobel de Física de 1965 Richard Feynman, ens serveix per exemplificar el que intentem portar a terme. En aquest article, hem aprofundit en el coneixement dels detalls moleculars que succeeixen en el centre actiu d'una glicosidasa per tal de crear racionalment variants enzimàtiques amb funcions oposades.

Desxifrant el mecanisme de reacció per mitjà de tècniques computacionals, hem pogut detectar interaccions clau que es formen i es trenquen en passar pels diferents estadis de la reacció. La gran rellevància del pont d'hidrogen 2-OH...nu-

cleòfil, la pèrdua del qual fa modificar el mecanisme i augmentar les barreres energètiques de glicosilació i transglicosilació en 11 i 16 kcal/mol, respectivament, ens ha conduït a examinar el paper d'un residu contigu a l'enzim que interacciona amb l'hidroxil fent un pont d'hidrogen Asn175...2-OH. La supressió d'aquesta interacció fa que l'enzim sigui inactiu per a la glicosilació però actiu per a la transglicosilació, i podem aprofitar aquest fet per sintetitzar nous carbohidrats estables enfront de la hidròlisi secundària fent ús de substrats activats.

Aquest patró d'interacció, present en una multitud de glicosidases de diferents famílies, podria representar un clar objectiu d'experiments de mutagènesi per tal de generar noves variants sintètiques amb aplicacions biotecnològiques.

Agraïments

Aquest treball ha estat finançat pel Ministeri d'Economia i Competitivitat (MINECO) (projecte CTQ2014-55174) i per la Generalitat de Catalunya (2014SGR-987). Agraïm el suport dels grups del professor Ramón Hurtado-Guerrero (BIFI-Universitat de Saragossa) i del professor Daan van Aalten (Universitat de Dundee, Regne Unit), amb qui vam col·laborar en la investigació sobre l'enzim ScGas2, així com la col·laboració i les aclaridores discussions amb el professor Antoni Planas (Institut Químic de Sarrià) i amb el professor Gideon J. Davies (Universitat de York, Regne Unit) sobre la química de sucres. Lluís Raich agraeix també a la Universitat de Barcelona i a l'Institut de Química Teòrica i Computacional (IQTCUB) la beca APIF rebuda per fer el doctorat.

Referències

[1] OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. «Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease». *Cell*, núm. 126 (2006), p. 855-867.

[2] a) OSBORN, H. M.; EVANS, P. G.; GEMMELL, N.; OSBORNE, S. D. «Carbohydrate-based therapeutics». *J. Pharm. Pharmacol.*, núm. 56 (2004), p. 691-702. b) CIPOLLA, L.; ARAUJO, A. C.; BINI, D.; GABRIELLI, L.; RUSSO, L.; SHAIKH, N. «Discovery and design of carbohydrate-based therapeutics». *Expert Opin. Drug Discov.*, núm. 5 (2010), p. 721-737. c) FERNÁNDEZ-TEJADA, A.; CAÑADA, F. J.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. «Recent developments in synthetic carbohy-

drate-based diagnostics, vaccines, and therapeutics». *Chem. Eur. J.*, núm. 21 (2015), p. 10616-10628.

[3] FAJES, M.; PLANAS, A. «Oligosacàrids funcionals per síntesi enzimàtica. Nous enzims per a noves aplicacions». *TECA*, núm. 8 (2005), p. 5-13.

[4] GLOSTER, T. M.; VOCADLO, D. J. «Developing inhibitors of glycan processing enzymes as tools for enabling glycobiology». *Nat. Chem. Biol.*, núm. 8 (2012), p. 683-694.

[5] a) MALET, C.; PLANAS, A. «From beta-glucanase to beta-glucansynthase: glycosyl transfer to alpha-glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile». *FEBS Lett.*, núm. 440 (1998), p. 208-212.

b) MACKENZIE, L. F.; WANG, Q.; WARREN, R. A. J.; WITHERS, S. G. «Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 120 (1998), p. 5583-5584.

[6] TEWARI, Y. B.; GOLDBERG, R. N. «Thermodynamics of hydrolysis of disaccharides. Cellobiose, gentiobiose, isomaltose, and maltose». *J. Biol. Chem.*, núm. 264 (1989), p. 3966-3971.

[7] BISSARO, B.; MONSAN, P.; FAURÉ, R.; O'DONOHUE, M. J. «Glycosynthesis in a waterworld: new insight into the molecular basis of transglycosylation in retaining glycoside hydrolases». *Biochem. J.*, núm. 467 (2015), p. 17-35.

[8] ARDEVOL, A.; ROVIRA, C. «Reaction mechanisms in carbohydrate-active enzymes: glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Insights from *ab initio* quantum mechanics/molecular mechanics dynamic simulations». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 137 (2015), p. 7528-7547.

[9] BISSARO, B.; DURAND, J.; BIARNÉS, X.; PLANAS, A.; MONSAN, P.; O'DONOHUE, M. J.; FAURÉ, R. «Molecular design of non-Leloir furanose-transferring enzymes from an α -l-arabinofuranosidase: a rationale for the engineering of evolved transglycosylases». *ACS Catal.*, núm. 5 (2015), p. 4598-4611.

[10] RAICH, L.; BORODKIN, V.; FANG, W.; CASTRO-LÓPEZ, J.; AALTEN, D. M. van; HURTADO-GUERRERO, R.; ROVIRA, C. «A trapped covalent intermediate of a glycoside hydrolase on the pathway to transglycosylation. Insights from experiments and QM/MM simulations». *J. Am. Chem. Soc.* (2016). DOI: 10.1021/jacs.5b10092.

[En premsa]

[11] HARTLAND, R. P.; FONTAINE, T.; DEBEAUPUIS, J. P.; SIMENEL, C.; DELEPIERRE, M.; LATGE, J. P. «A novel beta-(1,3)-glucanoyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*». *J. Biol. Chem.*, núm. 271 (1996), p. 26843-26849.

[12] HURTADO-GUERRERO, R.; SCHUTTELKOPF, A. W.; MOUYNIA, I.; IBRAHIM, A. F.; SHEPHERD, S.; FONTAINE, T.; LATGE, J. P.; AALTEN, D. M. van. «Molecular mechanisms of yeast cell wall

glucan remodeling». *J. Biol. Chem.*, núm. 284 (2009), p. 8461-8469.

[13] WARSHEL, A.; LEVITT, M. «Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme». *J. Mol. Biol.*, núm. 103 (1976), p. 227-249.

[14] «Nobel Prizes 2013: M. Karplus, M. Levitt, A. Warshel». *Angew. Chem. Int. Ed.*, núm. 52 (2013), p. 11972.

[15] NAMCHUK, M. N.; WITHERS, S. G. «Mechanism of agrobacterium beta-glucosidase: kinetic analysis of the role of non-covalent enzyme/substrate interactions». *Biochemistry*, núm. 34 (1995), p. 16194-16202.

[16] QUESNE, M. G.; BOROWSKI, T.; VISSER, S. P. de. «Quantum mechanics/molecular mechanics modeling of enzymatic processes: caveats and breakthroughs». *Chem. Eur. J.*, núm. 22 (2016), p. 2562-2581.

[17] LAIO, A.; PARRINELLO, M. «Escaping free-energy minima». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 99 (2002), p. 12562-12566.

[18] a) SPECIALE, G.; THOMPSON, A. J.; DAVIES, G. J.; WILLIAMS, S. J. «Dissecting conformational contributions to glycosidase catalysis and inhibition». *Curr. Opin. Struct. Biol.*, núm. 28C (2014), p. 1-13. b) DAVIES, G. J.; PLANAS, A.; ROVIRA, C. «Conformational analyses of the reaction coordinate of glycosidases». *Acc. Chem. Res.*, núm. 45 (2012), p. 308-316.



L. Raich



C. Rovira

Lluís Raich és llicenciat en química per la Universitat de Barcelona (UB) (2012), amb un màster en química teòrica i computacional per la Universitat Rovira i Virgili. Ha realitzat dues estades d'investigació a la Universitat d'Estrasburg (França). Actualment està realitzant la tesi doctoral sobre mecanismes catalítics d'enzims actius en carbohidrats (en particular, investiga com es pot convertir una glicosidasa en una transglicosidasa), sota la direcció de la doctora Rovira, a la UB.

Carme Rovira és llicenciada i doctora en química per la Universitat de Barcelona (UB) (1995). Ha realitzat estades d'investigació a la Universitat Estatal de Carolina del Nord, a la Universitat del Sud d'Illinois (EUA) i al Max-Planck-Institut für Festkörperforschung (Alemanya). L'any 2003 va rebre la Distinció de la Generalitat de Catalunya per a la promoció de la recerca universitària en la categoria de joves investigadors. Des del 2007 és professora d'investigació ICREA. Actualment dirigeix el grup de Simulació Quàntica de Processos Biològics al Departament de Química Inorgànica i Orgànica de la UB.