

Simulação Computacional da Auto-Catálise da EPSPS de *Oryza sativa* das Mutações D334A e G362A

Anivaldo Xavier de Souza^{1,2}(PQ)*; Carlos Mauricio R. Sant'Anna²(PQ). anivaldo@ufrj.br

1- Colégio Técnico da UFRRJ. 2- Departamento de Química, ICE, UFRRJ.

Palavras Chave: EPSPS, PM3, chiquimato-3-fosfato

Introdução

A enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), catalisa a reação entre o fosfoenolpiruvato (PEP) e o chiquimato-3-fosfato (S3P) formando 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP)¹. Essa reação ocorre através de um processo adição-eliminação com formação de um intermediário tetraédrico (IT)². Por estar ausente em animais e ser essencial para plantas e microorganismos o entendimento desse mecanismo de reação é interessante para o desenvolvimento de fungicidas, bactericidas e herbicidas². Foi sugerido que na etapa de eliminação ocorre uma auto-catálise, com o grupo fosfato do IT da reação atuando como base interna³. Nossos estudos anteriores mostraram que essa proposta é um possível mecanismo para a etapa de eliminação⁴. Foi mostrado pelas mutações G341A e D313A que esses resíduos desempenham papel importante na estabilização do IT da EPSPS de *Escherichia coli*⁵. Com o objetivo de avançar no entendimento desse mecanismo de reação em plantas, nesse trabalho são comparadas duas simulações computacionais da etapa de eliminação da reação entre o S3P e o PEP catalisada pela EPSPS de *Oryza sativa*. Na numeração de *O. sativa*, as mutações são G362A e D334A. Para as simulações computacionais foi construído um modelo de homologia da EPSPS de *O. sativa* tendo como molde a estrutura cristalográfica da EPSPS de *E. coli* (1X8R e 1G6S)⁶. Os cálculos, usando o método PM3⁷ do programa Mopac2009, foram feitos com os aminoácidos com pelo menos um átomo em uma esfera de 6,5 Å de raio em torno do IT. Foi usado o método COSMO⁸ para incluir efeitos da constante dielétrica. Como o modelo tinha 728 átomos foi usado o método de escalonamento linear Mozyme⁹.

Resultados e Discussão

Partindo do IT, as duas simulações computacionais foram realizadas variando-se as distâncias d_1 e d_2 . O aumento da distância d_1 aproxima um hidrogênio metílico até um dos oxigênios do grupo do fosfato que foi originado do fragmento do PEP. O aumento da distância d_2 afasta o grupo fosfato provocando a formação do produto EPSP. A distância d_1 variou entre 1,10 e 2,10 Å (incremento de 0,2 Å) e a d_2 entre 1,38 e 3,18 (incremento de 0,2 Å). As distâncias d_1 e d_2 foram permutadas gerando 60 estruturas, para cada mutação, que tiveram seus calores de formação calculados. Foram construídas

superfícies da energia em função das distâncias (figura 1a e 1b).

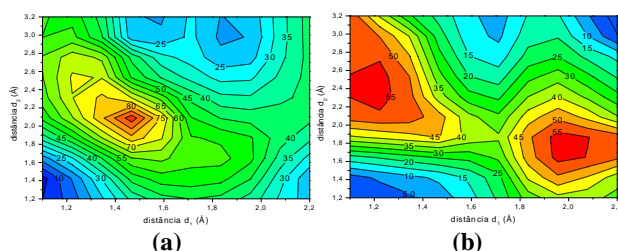


Figura 1. Superfícies de energia para a EPSPS com a mutação do G362 (a) e D334 (b) para Alanina.

A análise da figura 1a mostra que, na dinâmica do mecanismo de reação ocorre primeiro a abstração do hidrogênio formando um carbânion e depois ocorre à saída do grupo do fosfato protonado, após ultrapassar uma barreira de 40 kcal/mol. A análise da figura 1b mostra que o mecanismo ocorre, aparentemente concertado e a EPSP se forma após ultrapassar uma barreira de energia de 35 kcal/mol. Essas simulações envolvendo mutação têm barreiras bem maiores do que os resultados obtidos anteriormente⁴, sem mutação.

Conclusões

Podemos concluir que o mecanismo de auto-catálise é sensível ao efeito das mutações G362A e D334A, corroborando a proposta deste como um possível mecanismo para a etapa de eliminação³.

Agradecimentos

FAPERJ e CNPq

- ¹ Lewis, J., Johnson, K. A., Anderson, K. S. *Biochemistry*, 38, 7372, 1999
- ² Eschenburg, S.; Kabsch, W.; Healy, M. L.; Schönbrunn, E. J. *Biol. Chem.*, v-278, p-49215-49222, 2003.
- ³ An, M., Maitra, Neidlein, U., Bartlett, P. A.; *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 12759-12767.
- ⁴ Souza, A. X., Sant'Anna, C. M. R. 31^a RASBQ, resumo QB017, 2008.
- ⁵ Bertí, J. B.; Chindemi, P. *Biochemistry*, 48, 3699-3707, 2009
- ⁶ Priestman, M. A. *et al. Biochemistry*, v-44, p-3241-3248, 2005.
- ⁷ Stewart, J. J. P.; *J. Comp. Chem.* 1989, 10, 209.
- ⁸ Klamt, A.; Schüümann, G. *J. Chem. Soc. Perkin Transactions*, 1993, 2, p.799-805.
- ⁹ Stewart, J. J. P. *Int. J. Quantum Chem.* 58, 113, 1996.