

ESTUDO TEÓRICO DO SISTEMA DE TRANSFERÊNCIA DE PRÓTONS
DAS SERINOPROTEASE NO VÁCUO

Fulvia M.L.G. Stamato, Elson Longo e Luis M. Yoshioka

*Departamento de Química
Universidade Federal de São Carlos
Caixa Postal 676 - 13560 - São Carlos-SP*

e

Ricardo C. Ferreira

*Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
Av. Wenceslau Braz, 71
22290 - Rio de Janeiro-RJ*

Recebido em 04/07/84

As serinoproteases constituem uma classe de enzimas proteolíticas caracterizadas pela presença de um único resíduo reativo de serina. São bem conhecidas duas famílias de serinoproteases: a da tripsina, à qual pertencem também a α -quimotripsina e a elastase, entre outras, e que ocorre não só entre os vertebrados e outros organismos superiores mas também entre os procariótidas, e a da subtilisina, que ocorre apenas nos bacilos. Apesar de as estruturas tridimensionais dessas duas famílias serem completamente distintas, o que parece indicar que evoluíram independentemente a partir de enzimas ancestrais diferentes, apresentam os mesmos grupos catalíticos dispostos com a mesma geometria. Trata-se, pois, de um caso interessante de convergência evolutiva.

Devido à ocorrência abundante, facilidade de purificação e diversidade de funções biológicas que podem exercer, as serinoproteases têm sido intensivamente estudadas, tendo-se verificado que apresentam uma série de propriedades em comum. Por exemplo, todas apresentam um resíduo reativo de serina; o centro ativo, em todos os casos, é constituído pela mesma tríade de aminoácidos: a serina reativa, uma histidina e um aspartato (embora a numeração destes resíduos seja diferente nas duas famílias); o mecanismo de ação parece ser sempre o mesmo, independentemente da família da enzima ou do tipo de substrato a ser hidrolisado, e pode ser descrito como um ataque nucleofílico do átomo de oxigênio hidroxílico O_γ da serina reativa sobre o átomo de carbono carboxílico do substrato, catalisado por uma base geral.

Blow *et al*¹ descreveram a tríade de aminoácidos do centro ativo como um sistema de transferência de cargas ligado por um conjunto de pontes de hidrogênio. A carga negativa do aspartato interno é levada por meio deste sistema até o átomo O_γ da serina reativa localizado na superfície da molécula através do anel imidazol da histidina, aumentando assim o caráter nucleofílico deste átomo. Wang² e Polgár e Bender³ propuseram outro mecanismo, segundo o qual o aumento da nucleofilicidade do O_γ da

serina é devido à transferência de um único próton deste para a histidina, originando-se a estrutura multipolar $Asp^-His^+Ser^-$.

Diversos trabalhos experimentais foram realizados com o objetivo de identificar a forma cataliticamente ativa da tríade de aminoácidos ($Asp^0His^0Ser^-$ ou $Asp^-His^+Ser^-$). Os resultados obtidos por espectroscopia de RMN e IV não são conclusivos, visto que alguns⁴⁻⁶ apoiam a hipótese de dupla transferência de prótons de Blow *et al*¹ e outros⁷⁻⁹, a de transferência única. Recentemente, Kossiakoff e Spencer^{10,11} identificaram a His-57 como o grupo que age como base no centro ativo das serinoproteases, através do estudo de difração de neutrons da tripsina. Este trabalho pode ser considerado como comprovação experimental definitiva da validade da hipótese de transferência única de próton.

Nos últimos anos foram realizados diversos trabalhos teóricos visando a esclarecer, através do estudo das propriedades eletrônicas da tríade de aminoácidos, como ocorre a transferência do próton. Em trabalho recente¹² procuramos verificar de que forma a interação da tríade de aminoácidos com uma molécula do substrato e uma molécula de água situada no centro ativo poderia afetar a estabilidade relativa dos diferentes estados de protonação da α -quimotripsina.

O método utilizado para os cálculos foi o INDO¹³ e as coordenadas cristalográficas da α -quimotripsina foram fornecidas pelo Protein Data Bank¹⁴. No modelo utilizado para representar o centro ativo da enzima, os resíduos Asp-102, His-57 e Ser-195 foram substituídos, respectivamente, pelo ânion formiato, uma molécula de imidazol e uma de metanol. A molécula do substrato foi representada pelo acetato de metila e as coordenadas de seus átomos foram construídas de forma a reproduzir as do éster metílico do N-acetil-L-triptofano (NALT), que é um substrato natural da enzima. Para representar a molécula de água que participa de uma etapa posterior da reação enzimática,

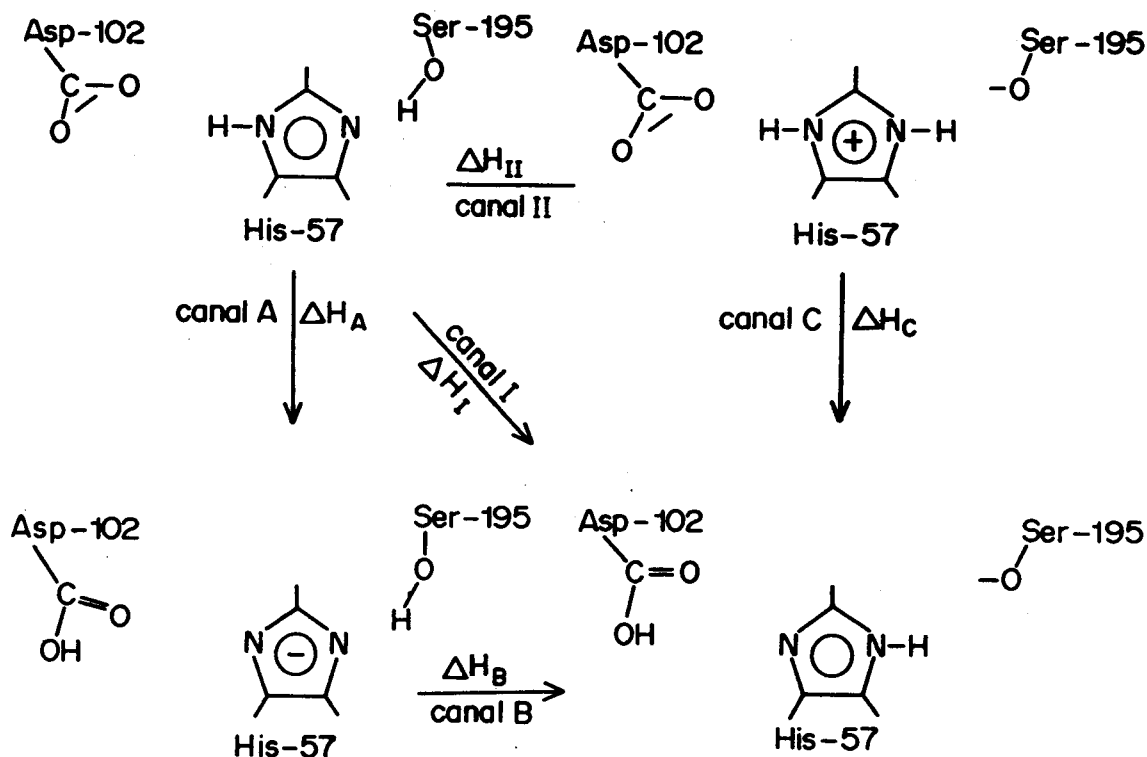


Fig. 1 Diferentes possibilidades de transferência de prótons nas serinoproteases.

foi escolhida uma das 50 moléculas de água que cristalizam junto com a enzima. A molécula selecionada está situada numa posição que lhe permite interagir simultaneamente com o centro ativo e o substrato.

Foram estudados os diferentes canais de transparência do próton do centro ativo da α -quimotripsina representados na figura 1. O canal I corresponde à dupla transferência de prótons, segundo Blow *et al*¹, a qual pode ocorrer simultaneamente ou através das etapas A e B. O canal A corresponde à passagem do próton do N δ_1 da His-57 ao O δ do Asp-102 (formação da estrutura imidazolato Asp⁰His⁻Ser⁰) e o canal B, à transferência subsequente do próton do O γ da Ser-195 ao N ϵ_2 do imidazolato. O canal II corresponde ao deslocamento de um único próton do O γ da Ser-195 ao N ϵ_2 da His-57, conforme proposto por Wang² e Polgár e Bender³.

A fim de se verificar em qual dos resíduos do centro ativo uma carga negativa estaria preferencialmente localizada, foram inicialmente calculadas as afinidades protônicas do imidazol e dos ânions imidazolato, metanolato e formiato. Os resultados obtidos pelo método INDO, foram comparados aos calculados por métodos *ab initio* e resultados experimentais. Verificou-se que o INDO superestima os valores das afinidades protônicas, porém reproduz qualitativamente a tendência correta: ânion metanolato > ânion imidazolato > ânion formiato. Assim sendo, a carga negativa estaria localizada preferencialmente no formiato. Verificou-se ainda que os resultados INDO para a dupla transferência do próton subestimam os valores da energia em relação ao cálculo *ab initio* 4-31G, enquanto que o inverso ocorre para a estrutura multipolar, que é superestimada. Os resultados subsequentes foram corrigidos de forma a compensar estes erros no cálculo das afinidades protônicas devidos ao uso de conjunto de base mínima.

A seguir, analisou-se o papel das ligações hidrogênio do centro ativo, procurando-se verificar se a transferência do próton ocorre mais facilmente entre resíduos ligados por pontes de hidrogênio do que na ausência destas. Verificou-se que a simples presença de ligação hidrogênio entre pares de resíduos não é suficiente para reverter a tendência de deslocamento de prótons verificados quando estas ligações não estão presentes. Observou-se ainda que a formação da estrutura multipolar requer a maior energia entre as alternativas consideradas, enquanto que a formação do íon imidazolato é favorecida em relação às demais formas de transferência do próton.

A seguir foi estudado o deslocamento protônico através de uma tríade de aminoácidos formando um sistema de ligações hidrogênio acopladas. Para isto, determinaram-se as energias de interação do sistema, definidas como a diferença de energia entre a supermolécula (sistema de pontes de hidrogênio) e as moléculas isoladas. Verificou-se que a formação da supermolécula estabiliza o sistema, em todos os casos, com relação às moléculas isoladas. A forma multicarregada Asp⁻...His⁺...Ser⁻ é a mais estabilizada, mas continua tendo energia superior à estrutura de dupla transferência Asp⁰...His⁰...Ser⁻. Esta, por sua vez, deveria originar-se através das etapas A e B e não por transferência simultânea dos dois prótons.

O papel desempenhado pela molécula de água que participa do mecanismo de ação da enzima e a influência do substrato sobre a transferência do próton foram também determinados. Verifica-se, na tabela 1, que o canal I é favorecido quando se consideram apenas os aminoácidos do centro ativo da enzima. Quando, porém, a molécula de água é introduzida nos cálculos, a forma multicarregada é estabilizada em 0,39 eV, enquanto que a introdução do substrato no sistema anterior acarreta uma estabilização adicional

Tabela 1 — Diferenças Energéticas entre a Tríade de Aminoácidos.

	$\Delta E(\text{eV})$
$\text{HCOO}^- \dots \text{Im} \dots \text{CH}_3\text{OH}$	0,0
$\text{HCOOH} \dots \text{Im}^- \dots \text{CH}_3\text{OH}$	-0,22
$\text{HCOOH} \dots \text{Im} \dots \text{CH}_3\text{O}^-$	1,24
$\text{HCOO}^- \dots \text{ImH}^+ \dots \text{CH}_3\text{O}^-$	3,51
$\text{HCOO}^- \dots \text{Im} \dots \text{CH}_3\text{OH} \dots \text{H}_2\text{O}$	0,0
$\text{HCOOH} \dots \text{Im}^- \dots \text{CH}_3\text{OH} \dots \text{H}_2\text{O}$	-0,16
$\text{HCOOH} \dots \text{Im} \dots \text{CH}_3\text{O}^- \dots \text{H}_2\text{O}$	0,90
$\text{HCOO}^- \dots \text{ImH}^+ \dots \text{CH}_3\text{O}^- \dots \text{H}_2\text{O}$	3,12
$\text{HCOO}^- \dots \text{Im} \dots \text{CH}_3\text{OH} \dots \text{Substr.}$	0,0
$\text{HCOOH} \dots \text{Im}^- \dots \text{CH}_3\text{OH} \dots \text{Substr.}$	0,56
$\text{HCOOH} \dots \text{Im} \dots \text{CH}_3\text{O}^- \dots \text{Substr.}$	1,10
$\text{HCOO}^- \dots \text{ImH}^+ \dots \text{CH}_3\text{O}^- \dots \text{Substr.}$	3,40
$\text{HCOO}^- \dots \text{Im} \dots \text{CH}_3\text{OH} \dots \text{H}_2\text{O} \dots \text{Substr.}$	0,0
$\text{HCOOH} \dots \text{Im}^- \dots \text{CH}_3\text{OH} \dots \text{H}_2\text{O} \dots \text{Substr.}$	0,60
$\text{HCOOH} \dots \text{Im} \dots \text{CH}_3\text{O}^- \dots \text{H}_2\text{O} \dots \text{Substr.}$	1,63
$\text{HCOO}^- \dots \text{ImH}^+ \dots \text{CH}_3\text{O}^- \dots \text{H}_2\text{O} \dots \text{Substr.}$	3,00

de 0,12 eV. Por outro lado, o acesso à estrutura do imidazolato (canal A) vai sendo progressivamente dificultado à medida que estes fatores vão sendo considerados.

Em resumo, verificou-se que cálculos INDO, supondo-se o sistema no vácuo e na ausência de interações com a molécula de água e do substrato, indicam ser a estrutura de transferência do próton a mais provável para o disparo da reação enzimática. Todavia, se a molécula de água e o substrato forem introduzidos no cálculo, a energia de ativação para se obter a estrutura multicarregada diminui, enquanto que a barreira energética para a formação da estrutura do imidazolato aumenta. Assim, a molécula de água e o substrato, que são fatores essenciais da reação enzimática, tendem a favorecer a transferência única do próton (canal II) por dificultarem o acesso à estrutura do imidazolato, que é a etapa inicial do processo de dupla transferência.

Estes resultados foram confirmados em trabalho posterior¹⁵ realizado com o método INDO/ISCRF¹⁶, no qual os efeitos devidos aos campos elétricos e de polarização gerados pelo esqueleto da proteína foram explicitamente introduzidos nos cálculos. Verificou-se que os campos intraprotéicos tendem a estabilizar a forma multicarregada (canal II) ainda mais do que indicaram os resultados para o vácuo. Por outro lado, o canal I é seletivamente bloqueado devido à desestabilização da estrutura do imidazolato na presença dos campos permanente e de polarização da proteína.

Referências:

- ¹ D.M. Blow, J.J. Birktoft e B.S. Hartley, *Nature* (London), 221, 337 (1969).
- ² J.H. Wang, *Science*, 161, 328 (1968).
- ³ L. Polgár e M.L. Bender, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 64, 1335 (1969).
- ⁴ M.W. Hunkapiller, S.H. Smallcombe, D.R. Whitaker e J.H. Richards, *Biochemistry*, 12, 4732 (1973).
- ⁵ R.E. Koeppe e R.M. Stroud, *Biochemistry*, 15, 3450 (1976).
- ⁶ J.L. Markley e M.A. Porubcan, *J. Mol. Biol.*, 102, 487 (1976).
- ⁷ G. Robillard e R.G. Shullman, *J. Mol. Biol.*, 71, 507 (1972).
- ⁸ G. Robillard e R.G. Shullman, *J. Mol. Biol.*, 83, 267 (1974).
- ⁹ W.W. Bachovchin e J.D. Roberts, *J. Amer. Chem. Soc.*, 100, 8041 (1978).
- ¹⁰ A.A. Kossiakoff e S.A. Spencer, *Nature*, 228, 414 (1980).
- ¹¹ A.A. Kossiakoff e S.A. Spencer, *Biochemistry*, 20, 6462 (1981).
- ¹² F.M.L.G. Stamato, E. Longo, L.M. Yoshioka e R. Ferreira, *J. Theor. Biol.*, 107, 329 (1984).
- ¹³ J.A. Pople, D.P. Santry e G.A. Segal, *J. Chem. Phys.*, 43, s129 (1965).
- ¹⁴ Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, USA.
- ¹⁵ E. Longo, F.M.L.G. Stamato, R. Ferreira e O. Tapia, *J. Theor. Biol.*, (submetido), 1984.
- ¹⁶ O. Tapia, G. Johannin, *J. Chem. Phys.*, 75, 3624 (1981).