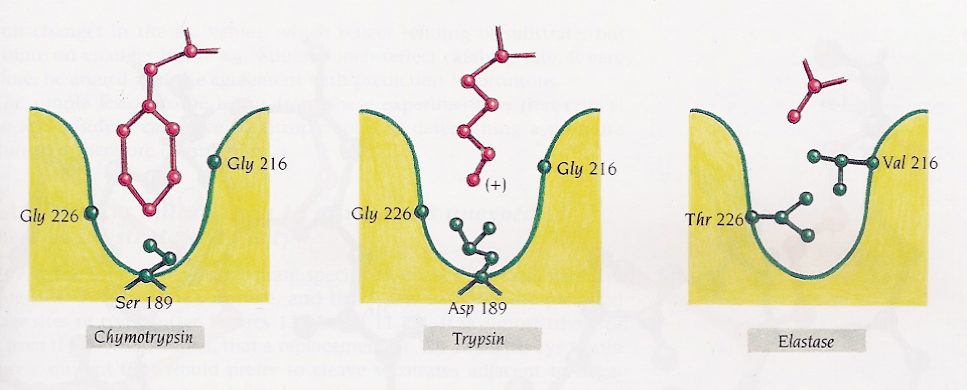
**ESTRUTURA E FUNÇÃO DE ENZIMAS: MECANISMO E ESPECIFICIDADE DE SERINA-PROTEINASES.**

Para discutirmos as relações entre estrutura, mecanismo de catálise e especificidade de enzimas, tomaremos como modelo as proteinases que têm uma Ser muito reativa no sítio ativo (por isso chamadas de serina-proteinases) e um mecanismo catalítico comum. Estas enzimas têm a função de degradar outras proteínas, daí o nome proteinase. Entre essas, as melhor caracterizadas são a quimotripsina, a tripsina e a elastase. A última tem esse nome porque é capaz de rapidamente digerir a proteína de tecido conjuntivo chamada elastina, que praticamente não é clivada por outras proteinases, porque possui grande quantidade de Gly, Ala e Val. As três enzimas são proteinases digestivas produzidas pelo pâncreas e secretadas para o duodeno.

**Bolso de especificidade:**

As três enzimas clivam ligações internas de cadeias polipeptídicas do substrato e essa clivagem é feita na amida que forma a ligação peptídica. A ligação é muito estável e, na ausência de um catalisador, sua meia vida de hidrólise em pH neutro é de 10 a 1000 anos. A especificidade das proteinases difere no tipo de resíduo de aminoácido que contribuiu com a carboxila na formação da ligação peptídica clivada. Esses resíduos devem ser volumosos e hidrofóbicos para que a quimotripsina tenha atividade; carregados positivamente para sofrer ação da tripsina e pequenos e neutros para que a ligação seja clivada pela elastase.

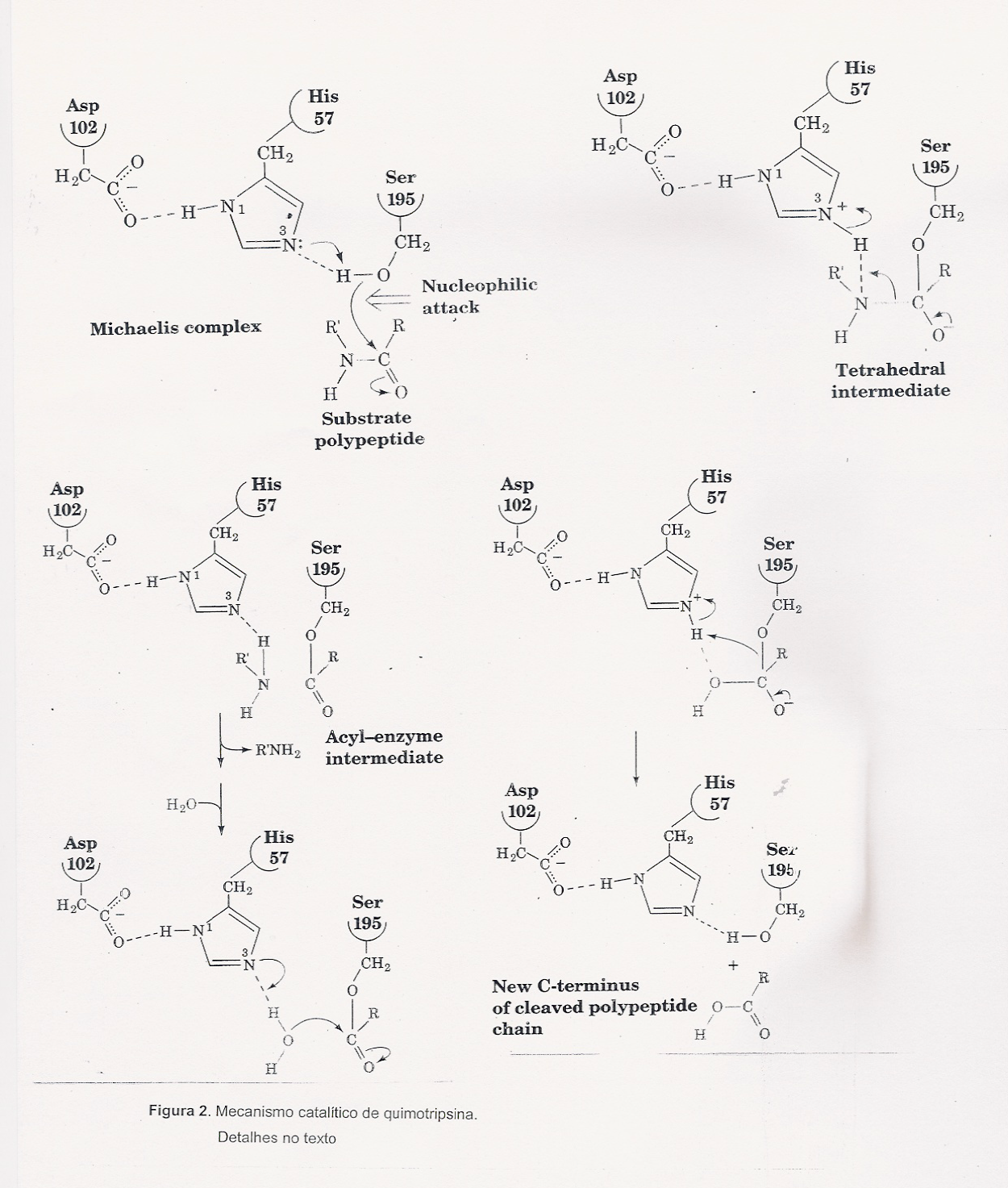
Essas preferências são um reflexo dos aminoácidos que compõem o bolso de especificidade, localizado próximo aos resíduos catalíticos. Na quimotripsina, no fundo de um desses bolsos, há um resíduo de Ser, que é substituído por um resíduo de Asp na tripsina. Já na elastase, as paredes laterais possuem aminoácidos volumosos no lugar das Gly presentes nas outras duas enzimas, permitindo somente a entrada de aminoácidos com cadeias laterais pequenas (Fig 1).

****

**Fig. 1.** Sítios que conferem especificidade a diferentes serina-proteinases. Reproduzido de Branden, C., Tooze, J. (1999) Introduction to Protein Structure. 2nd ed. Garland, New York.

**Mecanismo de ação da quimotripsina**

Um esquema do mecanismo de ação da quimotripsina está apresentado na Fig. 2, que deve ser analisada enquanto se lê o texto abaixo.



**Fig. 2.** Mecanismo catalítico da quimotripsina. Detalhes no texto.

Quando o substrato se liga ao sítio ativo, a serina da posição 195 (Ser195), que é o principal grupo catalítico, faz um ataque nucleofílico na carbonila da ligação peptídica a ser clivada. Isso é facilitado pelo fato do imidazol da His ligar o H+ que é liberado. Essa tomada do H+ pela His é, por sua vez, auxiliada pela presença do resíduo de Asp que faz uma ponte de H com a His. Esses três resíduos são chamados de tríade catalítica, pois, embora só a Ser seja essencial para a catálise, a constante catalítica decresce algumas ordens de grandeza se não houver a His ou Asp nessas posições.

Após o ataque nucleofílico e a transferência do H+**,** o C da carbonila da ligação a ser clivada torna-se tetraédrico eháuma distorção na molécula de substrato, que faz com que o oxigênio dessa carbonila ocupe uma região mais no interior do sítio ativo, ocupando a região conhecida como “cavidade do oxiânion”. Nessa região, ele forma duas pontes de H com a enzima que não podem ser formadas quando o grupo está na sua forma normal (estado fundamental do substrato). Além disso, forma-se mais uma ponte de H entre o grupo NH da ligação que será clivada. Desse modo é formado um intermediário tetraédrico, que é o estado de transição da reação. A enzima liga melhor o intermediário tetraédrico do que o substrato. Esse intermediário se decompõe formando uma acil-enzima (cadeia do substrato ligada a Ser covalentemente pela carboxila). A nova porção N-terminal da proteína, que estava interagindo com o imidazol da His é liberada para a solução e substituída por uma água.

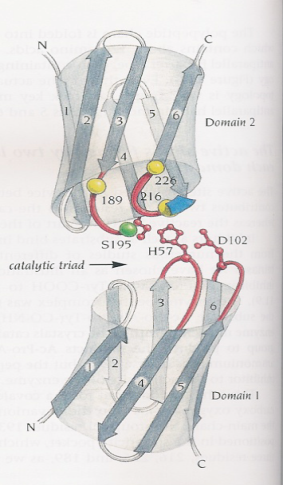
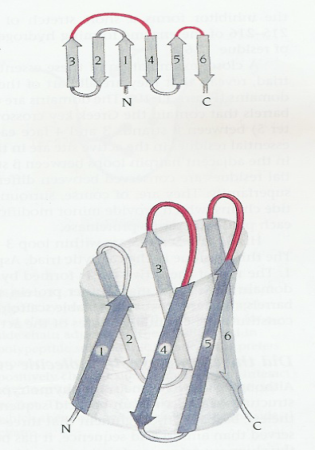
Os passos anteriores praticamente se repetem agora. A água é desprotonada pelo imidazol, adiciona-se ao carbono carbonílico gerando o mesmo intermediário tetraédrico. Esse se decompõe formando o outro fragmento peptídico e a Ser é re-protonada.

A Ser presente na quimotripsina é extremamente reativa e para isso a cadeia lateral precisa perder um H+. Em solução, a cadeia lateral da Ser não desprotona. Desse modo, o arranjo próximo da Ser com His e Asp, que só é conseguido dentro do sítio ativo da enzima, permite essa reatividade.

O fato do sítio ativo apresentar uma conformação tal que liga melhor o estado de transição que o estado fundamental do substrato é muito importante para a catálise. A quimotripsina nativa aumenta a velocidade da reação por um fator de cerca de 1010. Quando os três resíduos da tríade catalítica são mutados, a enzima ainda aumenta a velocidade da reação não catalisada em cerca de 104 vezes, aumento que é atribuído a maior ligação do estado de transição.

### Estrutura da quimotripsina

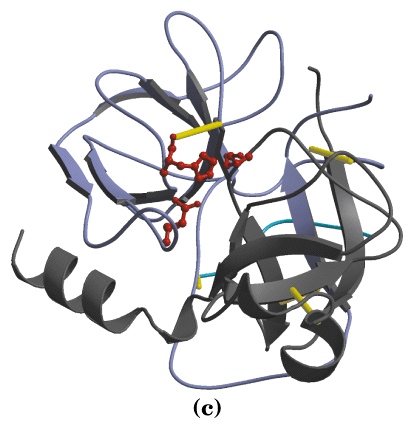
A cadeia da quimotripsina é formada por dois domínios do tipo β-barril, cuja topologia é um motivo chave grega (fitas 1-4), seguido por um motivo grampo (fitas 5 e 6) (Fig. 8, pg26). O sítio ativo está situado em uma fenda entre os dois domínios. O domínio 1 contribui com dois resíduos da tríade catalítica, His 57 e Asp 102, enquanto que a Ser 195 é parte do segundo domínio (Fig. 4). Apesar dessa descrição simples, a estrutura real parece um pouco complicada, porque um barril está torcido em relação ao outro e eles estão um pouco distorcidos (Fig. 3).



**Fig. 3.** A figura da esquerda mostra o arcabouço de um dos domínios da quimotripsina como constituído de chave grega e grampo. A figura da direita mostra a disposição da tríade catalítica em relação aos dois domínios da quimotripsina. Reproduzido de Branden, C., Tooze, J. (1999) Introduction to Protein Structure. 2nd ed. Garland, New York.

**Fig. 4.** Estrutura 3D da quimotripsina.

No círculo, a tríade catalítica.



**MULTIMÍDIA – *Catalytic mechanism of serine proteases***

<http://higheredbcs.wiley.com/legacy/college/voet/0470570954/guided_exps/4e_ch15_gex_12/serine_proteases_4e.html>